

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/013103

International filing date: 08 July 2005 (08.07.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-203637
Filing date: 09 July 2004 (09.07.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 11 August 2005 (11.08.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 7 月 9 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 2 0 3 6 3 7

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 2 0 3 6 3 7

出 願 人
Applicant(s): 中 外 製 薬 株 式 会 社

2 0 0 5 年 7 月 2 7 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	PCG-0004
【提出日】	平成16年 7月 9日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C07K 16/00
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内
【氏名】	中野 清孝
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内
【氏名】	吉野 武
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内
【氏名】	根津 淳一
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内
【氏名】	角田 浩行
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	井川 智之
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	小西 博子
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	田中 めぐみ
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	周郷 泉
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 中外製薬株式会社内
【氏名】	川合 重人
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 中外製薬株式会社内
【氏名】	石黒 敬弘
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 中外製薬株式会社内
【氏名】	木下 恭子
【特許出願人】	
【識別番号】	000003311
【氏名又は名称】	中外製薬株式会社
【代理人】	
【識別番号】	230104019
【弁護士】	
【氏名又は名称】	大野 聖二
【電話番号】	03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100106840

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 耕司

【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100105991

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 玲子

【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100114465

【弁理士】

【氏名又は名称】 北野 健

【電話番号】 03-5521-1530

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 185396

【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0409940

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

以下の (1)～(12)のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域を含む抗体：

- (1) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 (G C 3 3)
- (2) 配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1 (M 1 1 F 1)
- (3) 配列番号 1 0 6、1 0 7、1 0 8 (M 3 B 8)
- (4) 配列番号 1 3 2、1 3 3、1 3 4 (G C 1 9 9)
- (5) 配列番号 1 0 6、1 3 5、1 3 6 (G C 2 0 2)
- (6) 配列番号 1 2 6、1 2 7、1 2 8 (G C 1 7 9)
- (7) 配列番号 1 2 9、1 3 0、1 3 1 (G C 1 9 4)
- (8) 配列番号 1 0 3、1 0 4、1 0 5 (M 1 3 B 3)
- (9) 配列番号 1 1 8、1 2 1、1 2 2 (L 9 G 1 1)
- (10) 配列番号 1 1 5、1 1 6、1 1 7 (M 6 B 1)
- (11) 配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4 (M 5 B 9)
- (12) 配列番号 1 1 8、1 1 9、1 2 0 (M 1 0 D 2)。

【請求項 2】

以下の (1)～(13)のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体：

- (1) 配列番号 1 4 3、1 4 4、1 5 8 (G C 3 3)
- (2) 配列番号 1 4 3、1 4 4、1 4 5 (M 1 1 F 1)
- (3) 配列番号 1 4 0、1 4 1、1 4 2 (M 3 B 8)
- (4) 配列番号 1 6 7、1 6 8、1 6 9 (G C 1 9 9)
- (5) 配列番号 1 7 0、1 4 4、1 7 1 (G C 2 0 2)
- (6) 配列番号 1 5 9、1 6 0、1 6 1 (G C 1 7 9)
- (7) 配列番号 1 6 2、1 4 7、1 6 3 (G C 1 9 4 (1))
- (8) 配列番号 1 6 4、1 6 5、1 6 6 (G C 1 9 4 (2))
- (9) 配列番号 1 3 7、1 3 8、1 3 9 (M 1 3 B 3)
- (10) 配列番号 1 5 5、1 5 6、1 5 7 (L 9 G 1 1)
- (11) 配列番号 1 4 9、1 5 0、1 5 1 (M 6 B 1)
- (12) 配列番号 1 4 6、1 4 7、1 4 8 (M 5 B 9)
- (13) 配列番号 1 5 2、1 5 3、1 5 4 (M 1 0 D 2)。

【請求項 3】

以下の (1)～(13)の抗体：

- (1) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 3、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 3 3)
- (2) 配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 3、1 4 4、1 4 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 1 1 F 1)
- (3) 配列番号 1 0 6、1 0 7、1 0 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 0、1 4 1、1 4 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 3 B 8)
- (4) 配列番号 1 3 2、1 3 3、1 3 4 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 6 7、1 6 8、1 6 9 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 1 9 9)
- (5) 配列番号 1 0 6、1 3 5、1 3 6 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 0、1 4 4、1 7 1 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 2 0 2)
- (6) 配列番号 1 2 6、1 2 7、1 2 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する

重鎖可変領域、および配列番号 159、160、161 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC179)

(7) 配列番号 129、130、131 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 162、147、163 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC194 (1))

(8) 配列番号 129、130、131 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 164、165、166 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC194 (2))

(9) 配列番号 103、104、105 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 137、138、139 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M13B3)

(10) 配列番号 118、121、122 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 155、156、157 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (L9G11)

(11) 配列番号 115、116、117 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 149、150、151 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M6B1)

(12) 配列番号 112、113、114 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 146、147、148 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M5B9)

(13) 配列番号 118、119、120 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 152、153、154 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M10D2)

からなる群より選択される抗体。

【請求項 4】

以下の (1)～(7) のいずれかに記載の重鎖可変領域：

- (1) 配列番号 84 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.a)；
- (2) 配列番号 85 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.c)；
- (3) 配列番号 86 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.f)；
- (4) 配列番号 87 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.h)；
- (5) 配列番号 88 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.i)；
- (6) 配列番号 89 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.j)；
- (7) 配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.k)；

を有する抗体。

【請求項 5】

配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体

。

【請求項 6】

以下の (1)～(7) の抗体：

- (1) 配列番号 84 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.a) および配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体；
- (2) 配列番号 85 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.c) および配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体；
- (3) 配列番号 86 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.f) および配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体；
- (4) 配列番号 87 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.h) および配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体；
- (5) 配列番号 88 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.i) および配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体；
- (6) 配列番号 89 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.j) および配

列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver. a) を含む抗体；
(7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver. k) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver. a) を含む抗体；
からなる群より選択される抗体。

【請求項 7】

請求項 1－6 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつ請求項 1－6 のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体。

【請求項 8】

ヒト化抗体である請求項 1－7 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 9】

グリピカン 3 に結合するヒト化抗体。

【請求項 10】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 2 4 ～ 5 6 3 の配列からなるペプチドに結合する抗体。

【請求項 11】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 3 7 ～ 5 6 3 の配列からなるペプチドに結合する抗体。

【請求項 12】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 5 0 ～ 5 6 3 の配列からなるペプチドに結合しないことを特徴とする請求項 10 または 11 に記載の抗体。

【請求項 13】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 4 4 ～ 5 5 3 の配列からなるペプチドに結合する抗体。

【請求項 14】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 4 6 ～ 5 5 1 の配列からなるペプチドに結合する抗体。

【請求項 15】

ヒト化抗体である請求項 9－14 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 16】

配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 3、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体と、同じエピトープに結合する抗体。

【請求項 17】

グリピカン 3 に結合し、グリピカン 3 を発現する細胞に対して高い CDC 活性を有する抗体。

【請求項 18】

グリピカン 3 に結合し、グリピカン 3 を発現する細胞に対して高い ADC 活性を有する抗体。

【請求項 19】

請求項 1－18 のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 20】

配列番号 1 1－2 1、3 3－4 3、5 5－5 9、6 5－7 0、7 7－8 3 のいずれかに記載の塩基配列を有する、請求項 18 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 21】

請求項 1－18 のいずれかに記載の抗体を有効成分とする細胞増殖抑制剤。

【請求項 22】

請求項 1－18 のいずれかに記載の抗体を有効成分とする抗癌剤。

【請求項 23】

肝細胞癌を治療するための請求項 22 記載の抗癌剤。

【請求項 24】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 2 4 ～ 5 6 3 の配列からなるペプチド。

【請求項 25】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 3 7 ～ 5 6 3 の配列からなるペプチド。

【請求項 2 6】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 4 4 ～ 5 5 3 の配列からなるペプチド。

【請求項 2 7】

グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 4 6 ～ 5 5 1 の配列からなるペプチド

【請求項 2 8】

以下の (1) ～ (15) のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体：

- (1) 配列番号 1 7 4、1 4 4、1 5 8
- (2) 配列番号 1 7 5、1 4 4、1 5 8
- (3) 配列番号 1 7 6、1 4 4、1 5 8
- (4) 配列番号 1 7 7、1 4 4、1 5 8
- (5) 配列番号 1 7 8、1 4 4、1 5 8
- (6) 配列番号 1 7 9、1 4 4、1 5 8
- (7) 配列番号 1 8 0、1 4 4、1 5 8
- (8) 配列番号 1 8 1、1 4 4、1 5 8
- (9) 配列番号 1 8 2、1 4 4、1 5 8
- (10) 配列番号 1 8 3、1 4 4、1 5 8
- (11) 配列番号 1 8 4、1 4 4、1 5 8
- (12) 配列番号 1 8 5、1 4 4、1 5 8
- (13) 配列番号 1 8 6、1 4 4、1 5 8
- (14) 配列番号 1 8 7、1 4 4、1 5 8
- (15) 配列番号 1 8 8、1 4 4、1 5 8。

【請求項 2 9】

以下の (1) ～ (15) の抗体：

- (1) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (2) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (3) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (4) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 7、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (5) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 8、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (6) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 9、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (7) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 0、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (8) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 1、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (9) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する

重鎖可変領域、および配列番号 1 8 2、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(10) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 3、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(11) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(12) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(13) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(14) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 7、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(15) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 8、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

からなる群より選択される抗体。

【請求項 3 0】

以下の (1) ～ (15) のいずれかに記載の軽鎖可変領域：

- (1) 配列番号 1 9 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (2) 配列番号 1 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (3) 配列番号 1 9 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (4) 配列番号 1 9 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (5) 配列番号 1 9 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (6) 配列番号 1 9 6 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (7) 配列番号 1 9 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (8) 配列番号 1 9 8 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (9) 配列番号 1 9 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (10) 配列番号 2 0 0 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (11) 配列番号 2 0 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (12) 配列番号 2 0 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (13) 配列番号 2 0 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (14) 配列番号 2 0 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (15) 配列番号 2 0 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- を有する抗体。

【請求項 3 1】

以下の (1) ～ (15) からなる群より選択される軽鎖可変領域：

- (1) 配列番号 1 9 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (2) 配列番号 1 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (3) 配列番号 1 9 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (4) 配列番号 1 9 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (5) 配列番号 1 9 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (6) 配列番号 1 9 6 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (7) 配列番号 1 9 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (8) 配列番号 1 9 8 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (9) 配列番号 1 9 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

(10) 配列番号 2 0 0 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
(11) 配列番号 2 0 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
(12) 配列番号 2 0 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
(13) 配列番号 2 0 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
(14) 配列番号 2 0 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
(15) 配列番号 2 0 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
および、以下の (1)～(7) からなる群より選択される重鎖可変領域：

- (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

を有する抗体。

【請求項 3 2】

ヒト化抗体である請求項 2 8～3 1 のいずれかに記載の抗体。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗グリピカン 3 抗体

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗グリピカン 3 抗体、ならびにかかる抗体を有効成分とする細胞増殖抑制剤および抗癌剤に関する。

【背景技術】

【0002】

グリピカン 3 (GPC3) は、細胞表面上に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンのファミリーの 1 つであり、発生における細胞分裂や、癌細胞の増殖に関与している可能性があることが示唆されているが、その機能はまだよく解明されていない。

【0003】

GPC3 に結合するある種の抗体が、ADCC (抗体依存性細胞障害) 活性および CDC (補体依存性細胞障害) 活性により細胞増殖抑制作用を有することが見いだされている (WO2003/000883)。また、GPC3 が生体内で切断されて可溶性 GPC3 として血中に分泌され、これを検出する抗体を用いて癌の診断が可能であることが示唆されている (WO2004/022739、WO03/100429、WO2004018667)。

【0004】

抗体の細胞傷害活性を利用した抗癌剤を開発する場合、用いられる抗体は高い ADCC 活性又は CDC 活性を有していることが好ましい為、GPC3 を認識する抗体においても高い細胞傷害活性を有する抗 GPC3 抗体が望まれていた。

【特許文献 1】 WO2003/000883

【特許文献 2】 WO2004/022739

【特許文献 3】 WO03/100429

【特許文献 4】 WO2004018667

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、従来の抗体と比較して高い ADCC 活性および CDC 活性を有する抗 GPC3 抗体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは従来の抗グリピカン 3 抗体と比較して高い細胞傷害活性を有する抗体の取得に成功した。さらに、それらの抗体のエピトープを解析することにより、高い細胞傷害活性を発揮する為、抗体が認識すべき GPC3 上の部位を見出すことに成功した。

【0007】

本発明は、以下の (1)～(12) のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域を含む抗体：

- (1) 配列番号 123、124、125 (GC33)
- (2) 配列番号 109、110、111 (M11F1)
- (3) 配列番号 106、107、108 (M3B8)
- (4) 配列番号 132、133、134 (GC199)
- (5) 配列番号 106、135、136 (GC202)
- (6) 配列番号 126、127、128 (GC179)
- (7) 配列番号 129、130、131 (GC194)
- (8) 配列番号 103、104、105 (M13B3)
- (9) 配列番号 118、121、122 (L9G11)
- (10) 配列番号 115、116、117 (M6B1)
- (11) 配列番号 112、113、114 (M5B9)

(12) 配列番号 118、119、120 (M10D2)

を提供する。

【0008】

別の観点においては、本発明は、以下の(1)～(13)のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体：

- (1) 配列番号 143、144、158 (GC33)
- (2) 配列番号 143、144、145 (M11F1)
- (3) 配列番号 140、141、142 (M3B8)
- (4) 配列番号 167、168、169 (GC199)
- (5) 配列番号 170、144、171 (GC202)
- (6) 配列番号 159、160、161 (GC179)
- (7) 配列番号 162、147、163 (GC194 (1))
- (8) 配列番号 164、165、166 (GC194 (2))
- (9) 配列番号 137、138、139 (M13B3)
- (10) 配列番号 155、156、157 (L9G11)
- (11) 配列番号 149、150、151 (M6B1)
- (12) 配列番号 146、147、148 (M5B9)
- (13) 配列番号 152、153、154 (M10D2)

を提供する。

【0009】

好ましくは、本発明の抗体は、以下の(1)～(13)の抗体：

- (1) 配列番号 123、124、125に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 143、144、158に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC33)
- (2) 配列番号 109、110、111に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 143、144、145に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M11F1)
- (3) 配列番号 106、107、108に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 140、141、142に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M3B8)
- (4) 配列番号 132、133、134に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 167、168、169に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC199)
- (5) 配列番号 106、135、136に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 170、144、171に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC202)
- (6) 配列番号 126、127、128に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 159、160、161に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC179)
- (7) 配列番号 129、130、131に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 162、147、163に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC194 (1))
- (8) 配列番号 129、130、131に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 164、165、166に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC194 (2))
- (9) 配列番号 103、104、105に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 137、138、139に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M13B3)
- (10) 配列番号 118、121、122に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号 155、156、157に記載のアミノ酸配列からなる

CDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体（L 9 G 1 1）

(11) 配列番号 1 1 5、1 1 6、1 1 7 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 9、1 5 0、1 5 1 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体（M 6 B 1）

(12) 配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 6、1 4 7、1 4 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体（M 5 B 9）

(13) 配列番号 1 1 8、1 1 9、1 2 0 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 5 2、1 5 3、1 5 4 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体（M 1 0 D 2）

からなる群より選択される。

【0 0 1 0】

さらに別の観点においては、本発明は、以下の (1)～(7) のいずれかに記載の重鎖可変領域：

- (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.a）；
 - (2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.c）；
 - (3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.f）；
 - (4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.h）；
 - (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.i）；
 - (6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.j）；
 - (7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.k）；
- を有する抗体を提供する。

【0 0 1 1】

また別の観点においては、本発明は、配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（GC33 VL ver.a）を有する抗体を提供する。

【0 0 1 2】

好ましくは、本発明の抗体は、以下の (1)～(7) の抗体：

- (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.a）および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（GC33 VL ver.a）を有する抗体；
 - (2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.c）および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（GC33 VL ver.a）を有する抗体；
 - (3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.f）および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（GC33 VL ver.a）を有する抗体；
 - (4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.h）および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（GC33 VL ver.a）を有する抗体；
 - (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.i）および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（GC33 VL ver.a）を有する抗体；
 - (6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.j）および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（GC33 VL ver.a）を含む抗体；
 - (7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（GC33 VH ver.k）および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（GC33 VL ver.a）を含む抗体；
- からなる群より選択される。

【0 0 1 3】

さらに別の観点においては、本発明は以下の (1)～(15) のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体を提供する：

- (1) 配列番号 1 7 4、1 4 4、1 5 8
- (2) 配列番号 1 7 5、1 4 4、1 5 8
- (3) 配列番号 1 7 6、1 4 4、1 5 8
- (4) 配列番号 1 7 7、1 4 4、1 5 8
- (5) 配列番号 1 7 8、1 4 4、1 5 8

- (6) 配列番号 1 7 9、1 4 4、1 5 8
- (7) 配列番号 1 8 0、1 4 4、1 5 8
- (8) 配列番号 1 8 1、1 4 4、1 5 8
- (9) 配列番号 1 8 2、1 4 4、1 5 8
- (10) 配列番号 1 8 3、1 4 4、1 5 8
- (11) 配列番号 1 8 4、1 4 4、1 5 8
- (12) 配列番号 1 8 5、1 4 4、1 5 8
- (13) 配列番号 1 8 6、1 4 4、1 5 8
- (14) 配列番号 1 8 7、1 4 4、1 5 8
- (15) 配列番号 1 8 8、1 4 4、1 5 8。

【 0 0 1 4 】

さらに別の観点においては、本発明は以下の (1) ～ (15) のいずれかの抗体を提供する：

- (1) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (2) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (3) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (4) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 7、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (5) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 8、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (6) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 9、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (7) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 0、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (8) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 1、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (9) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 2、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (10) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 3、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (11) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (12) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (13) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる

CDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(14) 配列番号123、124、125に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号187、144、158に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(15) 配列番号123、124、125に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号188、144、158に記載のアミノ酸配列からなるCDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

【0015】

さらに別の観点においては、本発明は以下の(1)～(15)のいずれかに記載の軽鎖可変領域：

- (1) 配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (2) 配列番号192に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (3) 配列番号193に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (4) 配列番号194に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (5) 配列番号195に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (6) 配列番号196に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (7) 配列番号197に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (8) 配列番号198に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (9) 配列番号199に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (10) 配列番号200に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (11) 配列番号201に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (12) 配列番号202に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (13) 配列番号203に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (14) 配列番号204に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (15) 配列番号205に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- を有する抗体を提供する。

【0016】

さらに別の観点においては、本発明は以下の(1)～(15)からなる群より選択される軽鎖可変領域：

- (1) 配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (2) 配列番号192に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (3) 配列番号193に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (4) 配列番号194に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (5) 配列番号195に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (6) 配列番号196に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (7) 配列番号197に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (8) 配列番号198に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (9) 配列番号199に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (10) 配列番号200に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (11) 配列番号201に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (12) 配列番号202に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (13) 配列番号203に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (14) 配列番号204に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (15) 配列番号205に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- および、以下の(1)～(7)からなる群より選択される重鎖可変領域：

- (1) 配列番号84に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (2) 配列番号85に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (3) 配列番号86に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (4) 配列番号87に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (5) 配列番号88に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(6) 配列番号 89 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
(7) 配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
を有する抗体を提供する。

【0017】

また、上述のいずれかに記載の抗体のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつその抗体と同等の活性を有する抗体も本発明の範囲内である。好ましくは、本発明の抗体はヒト化抗体である。すなわち、別の観点においては、本発明はグリピカン 3 に結合するヒト化抗体を提供する。

【0018】

さらに別の観点においては、本発明は、グリピカン 3 のアミノ酸残基 524～563 の配列を有するペプチドに結合する抗体を提供する。好ましくは、本発明の抗体は、グリピカン 3 のアミノ酸残基 537～563 の配列を有するペプチドに結合する。また好ましくは、本発明の抗体は、グリピカン 3 のアミノ酸残基 550～563 の配列を有するペプチドに結合しないことを特徴とする。好ましくは、本発明の抗体は、グリピカン 3 のアミノ酸残基 544～553 の配列を有するペプチドに結合し、また好ましくは、グリピカン 3 のアミノ酸残基 546～551 の配列を有するペプチドに結合する。

【0019】

また別の観点においては、本発明は、配列番号 123、124、125 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 143、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体と、抗原との結合に於いて競合する抗体を提供する。

【0020】

さらに別の観点においては、本発明は、グリピカン 3 に結合し、かつグリピカン 3 を発現する細胞に対して高い CDC 活性を有する抗体、ならびに、グリピカン 3 を認識し、かつグリピカン 3 を発現する細胞に対して高い ADC 活性を有する抗体を提供する。

【0021】

さらに別の観点においては、本発明は、上述の本発明のいずれかの抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号 11-21、33-43、55-59、65-70、77-83 のいずれかに記載の塩基配列を有する。

【0022】

さらに別の観点においては、グリピカン 3 のアミノ酸残基 524～563 の配列からなるペプチド、グリピカン 3 のアミノ酸残基 537～563 の配列からなるペプチド、グリピカン 3 のアミノ酸残基 544～553 の配列からなるペプチド、又はグリピカン 3 のアミノ酸残基 546～551 の配列からなるペプチドを提供する。

【0023】

別の観点においては、本発明は、上述の本発明の抗体を有効成分とする細胞増殖抑制剤および抗癌剤を提供する。好ましくは、本発明の抗癌剤は、肝細胞癌を治療するために用いられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

抗体

本発明は、下記の (I)～(XI) に記載の抗体を提供する。

(I) 以下の (1)～(12) のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する重鎖可変領域を含む抗体：

- (1) 配列番号 123、124、125 (GC33)
- (2) 配列番号 109、110、111 (M11F1)
- (3) 配列番号 106、107、108 (M3B8)
- (4) 配列番号 132、133、134 (GC199)
- (5) 配列番号 106、135、136 (GC202)

- (6) 配列番号 1 2 6、1 2 7、1 2 8 (G C 1 7 9)
- (7) 配列番号 1 2 9、1 3 0、1 3 1 (G C 1 9 4)
- (8) 配列番号 1 0 3、1 0 4、1 0 5 (M 1 3 B 3)
- (9) 配列番号 1 1 8、1 2 1、1 2 2 (L 9 G 1 1)
- (10) 配列番号 1 1 5、1 1 6、1 1 7 (M 6 B 1)
- (11) 配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4 (M 5 B 9)
- (12) 配列番号 1 1 8、1 1 9、1 2 0 (M 1 0 D 2)。

【 0 0 2 5 】

上記 (1)～(12) の抗体の中で好ましいものは (1)～(8) の抗体であり、さらに好ましいものは (1)～(5) の抗体であり、特に好ましい抗体は (1) の抗体である。上記 (1)～(8) の抗体はグリピカン 3 の C 末端側ペプチド (グリピカン 3 の 3 7 4 番目のアミノ酸から 5 8 0 番目のアミノ酸までのペプチド) を認識するので治療用抗体として有用である。また、上記 (9)～(12) の抗体はグリピカン 3 の N 末端側ペプチド (グリピカン 3 の 1 番目のアミノ酸から 3 7 3 番目のアミノ酸までのペプチド) を認識するので診断用抗体として有用である。

【 0 0 2 6 】

(II) 以下の (1)～(13) のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体：

- (1) 配列番号 1 4 3、1 4 4、1 5 8 (G C 3 3)
- (2) 配列番号 1 4 3、1 4 4、1 4 5 (M 1 1 F 1)
- (3) 配列番号 1 4 0、1 4 1、1 4 2 (M 3 B 8)
- (4) 配列番号 1 6 7、1 6 8、1 6 9 (G C 1 9 9)
- (5) 配列番号 1 7 0、1 4 4、1 7 1 (G C 2 0 2)
- (6) 配列番号 1 5 9、1 6 0、1 6 1 (G C 1 7 9)
- (7) 配列番号 1 6 2、1 4 7、1 6 3 (G C 1 9 4 (1))
- (8) 配列番号 1 6 4、1 6 5、1 6 6 (G C 1 9 4 (2))
- (9) 配列番号 1 3 7、1 3 8、1 3 9 (M 1 3 B 3)
- (10) 配列番号 1 5 5、1 5 6、1 5 7 (L 9 G 1 1)
- (11) 配列番号 1 4 9、1 5 0、1 5 1 (M 6 B 1)
- (12) 配列番号 1 4 6、1 4 7、1 4 8 (M 5 B 9)
- (13) 配列番号 1 5 2、1 5 3、1 5 4 (M 1 0 D 2)。

【 0 0 2 7 】

上記 (1)～(13) の抗体の中で好ましいものは (1)～(8) の抗体であり、さらに好ましいものは (1)～(5) の抗体であり、特に好ましい抗体は (1) の抗体である。上記 (1)～(8) の抗体はグリピカン 3 の C 末端側ペプチド (グリピカン 3 の 3 7 4 番目のアミノ酸から 5 8 0 番目のアミノ酸までのペプチド) を認識するので治療用抗体として有用である。また、上記 (9)～(13) の抗体はグリピカン 3 の N 末端側ペプチド (グリピカン 3 の 1 番目のアミノ酸から 3 7 3 番目のアミノ酸までのペプチド) を認識するので診断用抗体として有用である。

【 0 0 2 8 】

(III) 以下の (1)～(13) の抗体：

- (1) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 3、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 3 3)
- (2) 配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 3、1 4 4、1 4 5 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 1 1 F 1)
- (3) 配列番号 1 0 6、1 0 7、1 0 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 0、1 4 1、1 4 2 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 3 B 8)

- (4) 配列番号 1 3 2、1 3 3、1 3 4 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 6 7、1 6 8、1 6 9 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 1 9 9)
- (5) 配列番号 1 0 6、1 3 5、1 3 6 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 0、1 4 4、1 7 1 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 2 0 2)
- (6) 配列番号 1 2 6、1 2 7、1 2 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 5 9、1 6 0、1 6 1 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 1 7 9)
- (7) 配列番号 1 2 9、1 3 0、1 3 1 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 6 2、1 4 7、1 6 3 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 1 9 4 (1))
- (8) 配列番号 1 2 9、1 3 0、1 3 1 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 6 4、1 6 5、1 6 6 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (G C 1 9 4 (2))
- (9) 配列番号 1 0 3、1 0 4、1 0 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 3 7、1 3 8、1 3 9 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 1 3 B 3)
- (10) 配列番号 1 1 8、1 2 1、1 2 2 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 5 5、1 5 6、1 5 7 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (L 9 G 1 1)
- (11) 配列番号 1 1 5、1 1 6、1 1 7 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 9、1 5 0、1 5 1 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 6 B 1)
- (12) 配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 6、1 4 7、1 4 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 5 B 9)
- (13) 配列番号 1 1 8、1 1 9、1 2 0 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 5 2、1 5 3、1 5 4 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 1 0 D 2)
- からなる群より選択される抗体。

【0 0 2 9】

上記 (1)～(13) の抗体の中で好ましいものは (1)～(8) の抗体であり、さらに好ましいものは (1)～(5) の抗体であり、特に好ましい抗体は (1) の抗体である。上記 (1)～(8) の抗体はグリピカン 3 の C 末端側ペプチド (グリピカン 3 の 3 7 4 番目のアミノ酸から 5 8 0 番目のアミノ酸までのペプチド) を認識するので治療用抗体として有用である。また、上記 (9)～(13) の抗体はグリピカン 3 の N 末端側ペプチド (グリピカン 3 の 1 番目のアミノ酸から 3 7 3 番目のアミノ酸までのペプチド) を認識するので診断用抗体として有用である。

【0 0 3 0】

(IV) 以下の (1)～(7) のいずれかに記載の重鎖可変領域：

- (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (G C 3 3 V H ver. a) ；
- (2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (G C 3 3 V H ver. c) ；
- (3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (G C 3 3 V H ver. f) ；
- (4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (G C 3 3 V H ver. h) ；
- (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (G C 3 3 V H ver. i) ；
- (6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (G C 3 3 V H ver. j) ；
- (7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (G C 3 3 V H ver. k) ；
- を有する抗体。

上記 (1)～(7) の抗体の中で特に好ましい抗体は (2)～(7) の抗体である。

【 0 0 3 1 】

(V) 配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体。

【 0 0 3 2 】

(VI) 以下の (1) ~ (7) の抗体：

- (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.a) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体；
 - (2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.c) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体；
 - (3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.f) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体；
 - (4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.h) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体；
 - (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.i) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体；
 - (6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.j) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体；
 - (7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.k) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体；
- からなる群より選択される抗体。

上記 (1) ~ (7) の抗体の中で特に好ましい抗体は (2) ~ (7) の抗体である。

【 0 0 3 3 】

(VII) 以下の (1) ~ (15) のいずれかの抗体：

- (1) 配列番号 1 7 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (2) 配列番号 1 7 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (3) 配列番号 1 7 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (4) 配列番号 1 7 7、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (5) 配列番号 1 7 8、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (6) 配列番号 1 7 9、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (7) 配列番号 1 8 0、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (8) 配列番号 1 8 1、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (9) 配列番号 1 8 2、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (10) 配列番号 1 8 3、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (11) 配列番号 1 8 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (12) 配列番号 1 8 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (13) 配列番号 1 8 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (14) 配列番号 1 8 7、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる C D R 1、2、3

【0035】

(IX) 以下の(1)～(15)のいずれかに記載の抗体：

- (1) 配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (2) 配列番号192に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (3) 配列番号193に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (4) 配列番号194に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (5) 配列番号195に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (6) 配列番号196に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (7) 配列番号197に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (8) 配列番号198に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (9) 配列番号199に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (10) 配列番号200に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (11) 配列番号201に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (12) 配列番号202に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (13) 配列番号203に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (14) 配列番号204に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (15) 配列番号205に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体。

【0036】

(X) 以下の(1)～(15)からなる群より選択される軽鎖可変領域：

- (1) 配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (2) 配列番号192に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (3) 配列番号193に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (4) 配列番号194に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (5) 配列番号195に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (6) 配列番号196に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (7) 配列番号197に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (8) 配列番号198に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (9) 配列番号199に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (10) 配列番号200に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (11) 配列番号201に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (12) 配列番号202に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (13) 配列番号203に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (14) 配列番号204に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (15) 配列番号205に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

および、以下の(1)～(7)からなる群より選択される重鎖可変領域：

- (1) 配列番号84に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (2) 配列番号85に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (3) 配列番号86に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (4) 配列番号87に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (5) 配列番号88に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (6) 配列番号89に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (7) 配列番号90に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

を有する抗体。

【0037】

(XI) 上記の(I)～(X)のいずれかに記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつ(I)～(X)のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体。

【0038】

本発明において、(I)～(X)のいずれかに記載の抗体と同等の活性とは、ヒトグリピカン3抗体への結合活性、またはヒトグリピカン3を発現する細胞（例えば、HepG2またはヒ

トグリピカン3発現組換えCHO細胞、など)への細胞傷害活性が同等であることをいう。

【0039】

ヒト化抗体

本発明における抗体の好ましい態様の一つとして、グリピカン3に結合するヒト化抗体を挙げることができる。ヒト化抗体は既知の方法を用いて製造することができる。

【0040】

ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている(欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576号公報参照)。

【0041】

具体的には、例えばCDRがマウス抗体由来である場合には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)とを連結するように設計したDNA配列を、CDRおよびFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する(WO98/13388号公報に記載の方法を参照)。

【0042】

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K.etal., CancerRes. (1993) 53, 851-856)。

【0043】

キメラ抗体およびヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。ヒト化の際に用いられるヒト抗体は、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDなど如何なるアイソタイプのヒト抗体でもよいが、本発明においてはIgGを用いることが好ましく、さらにIgG1又はIgG3が好ましく、特にIgG1が好ましい。IgG1は高い細胞傷害活性を有している点で抗体を抗癌剤として利用する場合に有効である(Chemical immunology, 65:88 (1997))。

【0044】

なお、ヒト化抗体を作製した後に、可変領域(例えば、FR)や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換等してもよい。

【0045】

ヒト化抗体におけるCDRの由来は特に限定されず、どのような動物由来でもよい。例えば、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ラクダ抗体などの配列を用いることが可能であるが、好ましくはマウス抗体のCDR配列である。

【0046】

抗体のヒト化において、通常、由来となった抗体のアゴニスト活性を維持したままヒト化を行うことは困難であるが、本発明においては、由来となったマウス抗体と同等のアゴニスト活性を有するヒト化抗体の取得に成功した。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下しているため、治療目的などでヒトに投与する場合に有用である。

【0047】

本発明においてヒト化抗グリピカン3抗体の好ましい例としては、例えば、配列番号84(GC33 VH ver.a)、配列番号85(GC33 VH ver.c)、配列番号86(GC33 VH ver.f)、配列番号87(GC33 VH ver.h)、配列番号88(GC33 VH ver.i)、配列番号89(GC33 VH ver.j)または配列番号90(GC33 VH ver.k)に記載の重鎖可変領域を有する抗体、または配列番号92(GC33 VL ver.a)に記載の軽鎖可変領域を有する抗体を挙げることができる。特に好ましい例としては、配列番号84(GC33 VH ver.a)、配列番号85(GC33 VH ver.c)、配列番号86(GC33 VH ver.f)、配列番号87(GC33 VH ver.h)

)、配列番号 88 (GC33 VH ver.i)、配列番号 89 (GC33 VH ver.j) または配列番号 90 (GC33 VH ver.k) に記載の重鎖可変領域と、配列番号 92 (GC33 VL ver.a) に記載の軽鎖可変領域とを有する抗体を挙げることができる。

【0048】

本発明における抗体の好ましい態様の一つとして、以下の(1)～(8)のいずれかに記載の抗体：

- (1) 配列番号 62 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 73 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 (GC33)；
 - (2) 配列番号 26 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 48 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 ((M11F1)；
 - (3) 配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 47 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 ((M3B8)；
 - (4) 配列番号 60 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 71 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 ((GC199)；
 - (5) 配列番号 61 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 72 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (GC202)；
 - (6) 配列番号 63 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 74 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (GC179)；
 - (7) 配列番号 64 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 75 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (GC194 (1))；
 - (8) 配列番号 64 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 76 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (GC194 (2))；
- が結合するエピトープに結合する抗体を挙げることができる。さらに好ましくは(1)～(5)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープに結合する抗体であり、特に好ましくは(1)に記載の抗体が結合するエピトープに結合する抗体である。

【0049】

上記いずれかの抗体が結合するエピトープに結合する抗体は、特に高い細胞傷害活性を有する点で有用である。

【0050】

上記(1)～(7)いずれかに記載の抗体はヒトグリピカン3の524番目のアミノ酸から580番目のアミノ酸までの領域に結合し、特に524番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域に結合する。上記(1)～(5)いずれかに記載の抗体はヒトグリピカン3の537番目のアミノ酸から563番目の領域に結合する。上記(1)に記載の抗体は、544番目のアミノ酸から553番目のアミノ酸の領域に結合し、特に546番目のアミノ酸から551番目の領域に結合する。

【0051】

上記エピトープを認識する抗体は、高い細胞傷害活性を有するので癌などの疾患の治療用として有用である。特に、546番目のアミノ酸から551番目の領域に結合する抗体は特に細胞傷害活性が高いので有用である。

【0052】

従って、本発明は、ヒトグリピカン3の524番目のアミノ酸から580番目のアミノ酸までの領域、好ましくは524番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域、さらに好ましくは537番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域、さらに好ましくは544番目のアミノ酸から553番目のアミノ酸までの領域、特に好ましくは546番目のアミノ酸から551番目のアミノ酸までの領域をエピトープとして、それらの領域に結合する抗体を含む。

【0053】

本発明において好ましい他の態様としては、ヒトグリピカン3の524番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域を認識し、かつ、537番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域を認識しない抗体を挙げることができる。

【0054】

さらに、本発明において好ましい他の態様としては、ヒトグリピカン3の537番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域を認識し、かつ、550番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域を認識しない抗体を挙げることができる。

【0055】

抗体が認識するエピトープの解析は当業者に公知の方法により行うことが可能であり、例えば実施例記載のウェスタンブロッティング法などにより行うことが可能である。

【0056】

上記の領域をエピトープとして認識する抗体は、当業者に公知の方法により得ることが可能であり、例えば、ヒトグリピカン3のアミノ酸配列を基に目的の領域のアミノ酸配列を含むペプチドを作製し、該ペプチドを免疫原として抗体を作製する方法や、通常の方法で抗体を作製した後、得られた抗体が認識するエピトープを決定し、目的のエピトープを認識する抗体を選択する方法などにより得ることが可能である。

【0057】

本発明の抗グリピカン3抗体の好ましい例としては、グリピカン3を発現する細胞に対して高いADCC活性を有する抗体または高いCDC活性を有する抗体を挙げることができる。

【0058】

本発明において高いADCC活性または高いCDC活性とは、公知の抗グリピカン3抗体よりも高いADCC活性または高いCDC活性を有することをいう。公知のグリピカン3抗体としては、W02004/22739に記載されているM3C11またはM1E07を挙げることができる。

【0059】

ADCC活性またはCDC活性の測定方法は、当業者に公知の方法により行うことが可能であり、例えば、クロム遊離試験により行うことが可能である。ADCC活性を測定する際のクロム遊離試験の具体的な条件としては、特に限定されないが、例えば、実施例記載の条件を用いて測定することができる。

【0060】

グリピカン3を発現する細胞としては、例えば、HepG2などの肝癌細胞、グリピカン3をコードする遺伝子を組み込まれたCHO細胞などを挙げることができる。ADCC活性を測定する場合にはHepG2細胞を用いることが好ましく、CDC活性を測定する場合にはGPC3発現組換えCHO細胞を用いることが好ましい。GPC3発現組換えCHO細胞は如何なる方法により作製されてもよいが、例えば実施例に記載の方法により作製することが可能である。

【0061】

抗グリピカン3抗体を抗癌剤として用いる場合には、配列番号62に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号73に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体(GC33)と同程度のADCC活性を有していることが好ましい。抗グリピカン3抗体を抗癌剤として用いる場合には、配列番号62に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号73に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体(GC33)と同程度のCDC活性を有していることが好ましい。

【0062】

さらに本発明はグリピカン3への結合活性が高い抗体を含む。

【0063】

本発明において、グリピカン3への結合活性は、当業者に公知の手段を使用して測定することができる。例えば、BIAcoreを用いた表面プラズモン共鳴を利用して測定することが可能である。すなわちセンサーチップ上にグリピカン3タンパク質を固定して抗体と反応させ、測定値から抗体とグリピカン3の相互作用を反応速度定数として算出することができる。また、結合活性の評価には、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、

酵素免疫測定法を用いる場合、被験抗体が結合する抗原をコーティングしたプレートに、被験抗体を含む試料、例えば、被験抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。結合活性の上限は特に限定されないが、例えば、当業者が技術的に作製可能な範囲の上限を設定することができる。しかしながら、技術的に作製可能な範囲は、技術の進歩により拡大される。

【0064】

さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換してもよい。脱アミド化されるアミノ酸としてはアスパラギン、グルタミンを挙げることができるが、好ましくはアスパラギンである。アスパラギンに隣接するアミノ酸としては、特に限定されずどのようなアミノ酸でもよいが、アスパラギン-グリシン配列は特に脱アミド化されやすいことが知られているので、アスパラギンに隣接するアミノ酸としてはグリシンが好ましい。置換後のアミノ酸としては、アスパラギンおよびグルタミン以外であれば特に限定されず、如何なるアミノ酸でもよいが、好ましくはバリン、プロリン以外のアミノ酸であることが好ましい。従って、本発明においては、抗体の脱アミド化を目的とする場合には、アスパラギン、グルタミン、バリン、プロリン以外のアミノ酸に置換することが好ましい。アミノ酸置換による脱アミド化の抑制については、例えばWO03/057881を参考に行うことが可能である。脱アミド化抑制を目的にアミノ酸置換を行う場合には、置換前の抗原結合活性を維持していることが好ましい。

【0065】

さらに、抗体安定化の他の態様として、グルタミン酸の他のアミノ酸への置換を挙げることができる。また、本発明では、抗体重鎖の6番目がグルタミン酸である場合、該グルタミン酸をグルタミンに置換することにより、顕著に抗体を安定化できることを見いだした。したがって、本発明は、抗体重鎖の6番目のグルタミン酸をグルタミンに置換することにより抗体を安定化する方法に関する。抗体中のアミノ酸番号は当業者に公知である（例えば、Kabat, E. A. et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services 1983）。

【0066】

抗体の作成方法

グリピカン3に結合する抗体は当業者に公知の方法により作成することができる。例えば、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、グリピカン3タンパク質またはグリピカン3発現細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0067】

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。まず、抗体取得の感作抗原として使用されるグリピカン3タンパク質を、配列番号3および4に示されるグリピカン3遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、グリピカン3をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトグリピカン3タンパク質を公知の方法で精製する。

【0068】

次に、この精製グリピカン3タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、グリピカン3の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはヒトグリピカン3のアミノ酸配列より化学合成により得ることも可能である。

【0069】

本発明の抗グリピカン3抗体の認識するグリピカン3分子上のエピトープは特定のもの

に限定されず、グリピカン3分子上に存在するエピトープならばどのエピトープを認識してもよい。従って、本発明の抗グリピカン3抗体を作製するための抗原は、グリピカン3分子上に存在するエピトープを含む断片ならば、如何なる断片も用いることが可能である。

【0070】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

【0071】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

【0072】

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0073】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (deSt. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

【0074】

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

【0075】

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0076】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

【0077】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液 (例えば平均分子量1000-6000程度) を通常30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

【0078】

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングを行う。

【0079】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでグリピカン3に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、グリピカン3への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるグリピカン3を投与して抗グリピカン3抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からグリピカン3に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W0 94/25585 号公報、W0 93/12227 号公報、W092/03918 号公報、W0 94/02602 号公報参照）。

【0080】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

【0081】

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0082】

抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型の抗体を作製することも可能である（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990参照）。

【0083】

具体的には、抗グリピカン3抗体を産生するハイブリドーマから、抗グリピカン3抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159）等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia製）等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia製）を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0084】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）等を使用することができる。

【0085】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオ

キシヌクレオチドチェーンターミネーション法等により確認する。

【0086】

目的とする抗グリピカン3抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

【0087】

本発明で使用する抗グリピカン3抗体を製造するには、通常、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

【0088】

抗体遺伝子の発現は、H鎖またはL鎖をコードするポリヌクレオチドを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするポリヌクレオチドを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい（W0 94/11523 号公報参照）。

【0089】

ポリヌクレオチド

別の観点においては、本発明は、本発明の抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを提供する。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号11-21、33-43、55-59、65-70、77-83のいずれかに記載の塩基配列を有する。また、該ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドも本発明の範囲内である。

【0090】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードする限り、特に限定されず、複数のデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）等の塩基または塩基対からなる重合体である。天然以外の塩基を含んでいてよい。本発明のポリヌクレオチドは、抗体を遺伝子工学的な手法により発現させる際に使用することができる。また本発明の抗体と同等な機能を有する抗体をスクリーニングする際に、プローブとして用いることもできる。即ち本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、またはその一部をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション、遺伝子増幅技術（例えばPCR）等の技術により、該ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするDNAを得ることができる。このようなDNAも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。

【0091】

ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）は当業者によく知られた技術である。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1% SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC、0.1% SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、5×SSCおよび0.1% SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するポリヌクレオチドが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0092】

これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により得られるポリヌクレオチドがコードする、本発明の抗体と機能的に同等な抗体は、通常、これら抗体とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明の抗体には、本発明の抗体と機能的に同等であり、かつ該抗体のアミノ酸配列と高い相同性を有する抗体も含まれる。高い相同性とは、アミ

ノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの相同性を決定するには、文献(Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

【0093】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。このようなベクターは、本発明の抗体を製造するために用いることができる。本発明のベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌(例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue)などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子(例えば、なんらかの薬剤(アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。

【0094】

本発明のベクターとしては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター(Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター(Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1(ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

【0095】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

【0096】

大腸菌以外にも、例えば、本発明のベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター(例えば、pcDNA3(インビトロゲン社製)や、pEGF-BOS(Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(ギブコBRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)が挙げられる。

【0097】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMTV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター(Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

【0098】

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHO1など）を導入し、メトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシバビローマウィルス（BPV）等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

【0099】

本発明の抗体を製造するためには、該ベクターを宿主細胞に導入する。ベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0100】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO（J. Exp. Med. (1995) 108, 945）、COS、3T3、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞（Valles, et al., Nature (1981) 291, 358-340）、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。本発明においては、CHO-DG44、CHO-DXB11、COS7細胞、BHK細胞が好適に用いられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP（ペーリンガー・マンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

【0101】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム（*Nicotiana tabacum*）由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス（*Saccharomyces*）属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、サッカロミセス・ポンベ（*Saccharomyces pombe*）糸状菌、例えば、アスペルギルス（*Aspergillus*）属、例えば、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）が知られている。

【0102】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌（*E. coli*）、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

【0103】

組換え抗体の製造

本発明の抗体は、上記宿主細胞を培養することにより製造することができる。目的とするポリヌクレオチドにより形質転換された細胞をin vitroで培養することにより、抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、FBS、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6～8であるのが好ましい。培養は、通常、約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0104】

一方、in vivoでポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物または植物に目的とするポリヌクレオチドを導入し、動物または植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

【0105】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0106】

例えば、目的とするポリヌクレオチドを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生される抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0107】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の抗体をコードするポリヌクレオチドを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の抗体を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

【0108】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする抗体をコードするポリヌクレオチドを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0109】

以上のようにして得られた抗体は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればポリペプチドを分離、精製することができる。

【0110】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

【0111】

なお、抗体の精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより

、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

【0112】

診断方法

別の観点においては、本発明は、本発明の抗体を用いて被検試料中のGPC3タンパク質を検出し、癌などの疾患の診断を行う方法を提供する。

【0113】

検出とは、定量的または非定量的な検出を含み、例えば、非定量的な検出としては、単にGPC3タンパク質が存在するか否かの測定、GPC3タンパク質が一定の量以上存在するか否かの測定、GPC3タンパク質の量を他の試料（例えば、コントロール試料など）と比較する測定などを挙げることができ、定量的な検出としては、GPC3タンパク質の濃度の測定、GPC3タンパク質の量の測定などを挙げることができる。

【0114】

被検試料とは、GPC3タンパク質が含まれる可能性のある試料であれば特に制限されないが、哺乳類などの生物の体から採取された試料が好ましく、さらに好ましくはヒトから採取された試料である。被検試料の具体的な例としては、例えば、血液、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液、唾液、などを挙げることができるが、好ましいものは血液、血清、血漿である。また、生物の体から採取された細胞の培養液などの、被検試料から得られる試料も本発明の被検試料に含まれる。

【0115】

診断される癌は、特に制限されず、具体的には、肝癌、膵臓癌、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫などを挙げることができるが、好ましいものは肝癌である。検出するGPC3は、特に限定されず、全長GPC3でも、その断片でもよい。GPC3断片を検出する場合には、N端断片でもC端断片でもよいが、好ましくはN端断片である。また、ヘパラン硫酸などが付加されたGPC3タンパク質でも、GPC3コアタンパク質でもよい。

【0116】

被検試料に含まれるGPC3タンパク質の検出方法は特に限定されないが、抗GPC3抗体を用いた免疫学的方法により検出することが好ましい。免疫学的方法としては、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法などを挙げることができるが、好ましくはエンザイムイムノアッセイであり、特に好ましいものは酵素結合免疫吸着定量法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)（例えば、sandwich ELISA）である。ELISAなどの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことが可能である。

【0117】

抗GPC3抗体を用いた一般的な検出方法としては、例えば、抗GPC3抗体を支持体に固定し、ここに被検試料を加え、インキュベーションを行い抗GPC3抗体とGPC3タンパク質を結合させた後に洗浄して、抗GPC3抗体を介して支持体に結合したGPC3タンパク質を検出することにより、被検試料中のGPC3タンパク質の検出を行う方法を挙げることができる。

【0118】

抗GPC3抗体とGPC3タンパク質との結合は、通常、緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、Tris緩衝液などが使用される。また、インキュベーションの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば、4℃～室温にて1時間～24時間のインキュベーションが行われる。インキュベート後の洗浄は、GPC3タンパク質と抗GPC3抗体の結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば、Tween20等の界面活性剤を含む緩衝液などが使用される。

【0119】

本発明のGPC3タンパク質検出方法においては、GPC3タンパク質を検出したい被検試料の他に、コントロール試料を設置してもよい。コントロール試料としては、GPC3タンパク質を含まない陰性コントロール試料やGPC3タンパク質を含む陽性コントロール試料などがあ

る。この場合、GPC3タンパク質を含まない陰性コントロール試料で得られた結果、GPC3タンパク質を含む陽性コントロール試料で得られた結果と比較することにより、被検試料中のGPC3タンパク質を検出することが可能である。また、コントロール試料および被検試料の検出結果を数値として得、それらの数値を比較することにより、被検試料に含まれるGPC3タンパク質を定量的に検出することも可能である。

【0120】

抗GPC3抗体を介して支持体に結合したGPC3タンパク質の検出の好ましい態様として、標識物質で標識された抗GPC3抗体を用いる方法を挙げることができる。例えば、支持体に固定された抗GPC3抗体に被検試料を接触させ、洗浄後に、GPC3タンパク質を特異的に結合する標識抗体を用いて検出する。

【0121】

抗GPC3抗体の標識は通常知られている方法により行うことが可能である。標識物質としては、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、放射性物質などの当業者に公知の標識物質を用いることが可能であり、具体的な例としては、ラジオアイソトープ(^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I など)、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ビオチンなどを挙げることができる。標識物質としてビオチンを用いる場合には、ビオチン標識抗体を添加後に、アルカリホスファターゼなどの酵素を結合させたアビジンをさらに添加することが好ましい。

【0122】

具体的には、抗GPC3抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗GPC3抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートに加える。インキュベートの後、洗浄し、標識抗GPC3抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、プレートに残った標識抗GPC3抗体を検出する。検出は当業者に公知の方法により行うことができ、例えば、放射性物質による標識の場合には液体シンチレーションやRIA法により検出することができる。酵素による標識の場合には基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出することができる。蛍光物質の場合には蛍光光度計により検出することができる。

【0123】

本発明のGPC3タンパク質検出方法の特に好ましい態様として、ビオチンで標識された抗GPC3抗体およびアビジンを用いる方法を挙げることができる。具体的には、抗GPC3抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗GPC3抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートに加える。インキュベートの後、洗浄し、ビオチン標識抗GPC3抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素と結合したアビジンを加える。インキュベーション後、プレートを洗浄し、アビジンに結合している酵素に対応した基質を加え、基質の酵素的変化などを指標にGPC3タンパク質を検出する。

【0124】

本発明のGPC3タンパク質検出方法の他の態様として、GPC3タンパク質を特異的に結合する一次抗体、および該一次抗体を特異的に結合する二次抗体を用いる方法を挙げることができる。例えば、支持体に固定された抗GPC3抗体に被検試料を接触させ、インキュベーションした後、洗浄し、洗浄後に結合しているGPC3タンパク質を、一次抗GPC3抗体および該一次抗体を特異的に結合する二次抗体により検出する。この場合、二次抗体は好ましくは標識物質により標識されている。

【0125】

具体的には、抗GPC3抗体を含む抗GPC3抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、

抗GPC3抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートに加える。インキュベートの後、洗浄し、一次抗GPC3抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、次いで一次抗体を特異的に結合する二次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、洗浄して、プレートに残った二次抗体を検出する。二次抗体の検出は前述の方法により行うことができる。

【0126】

医薬組成物

別の観点においては、本発明は、本発明の抗体を含有する医薬組成物を提供する。本発明の抗体を含有する医薬組成物は癌などの細胞増殖に関連する疾患の治療および／または予防に有用であり、特に肝癌の治療および／または予防に有用である。本発明の抗体を医薬組成物として用いる場合には、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0127】

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0128】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

【0129】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

【0130】

投与は好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局所的に投与することができる。

【0131】

また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。抗体または抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001~100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0132】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【実施例1】

【0133】

ヒトグリピカン3 (GPC3) のcDNAクローニング

ヒトGPC3をコードする全長cDNAは、大腸癌細胞株Caco2より常法により調製した1st strand cDNAを鋳型とし、Advantage2 kit (CLONTECH社) を用いたPCR反応により増幅した。すなわち、2 μ lのCaco2由来cDNA、1 μ lのセンスプライマー (GATATC-ATGGCCGGGACCGTGCC CACCGCGT: 配列番号1)、1 μ lのアンチセンスプライマー (GCTAGC-TCAGTGCACCAGGAAGAAG AAGCAC: 配列番号2)、5 μ lのAdvantage2 10xPCR buffer、8 μ lのdNTP mix (1.25 mM)、1 .0 μ lのAdvantage polymerase Mixを含む50 μ lの反応液を、94 $^{\circ}$ Cで1分、63 $^{\circ}$ Cで30秒、6 8 $^{\circ}$ Cで3分からなるサイクルを35回行った。PCR反応による増幅産物はpGEM-T Easy Vector System 1 (Promega社) を用いてTAベクターpGEM-T easyに挿入した。ABI3100 DNAシーケ ンサーを用い配列の確認を行った結果、ヒトGPC3の全長をコードするcDNAを単離した。配 列番号3で表される配列はヒトGPC3遺伝子の塩基配列を、配列番号4で表される配列はヒ トGPC3タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【実施例2】

【0134】

可溶型GPC3の作製

抗GPC3抗体作製のための免疫タンパク質として、C末端側の疎水性領域 (564-580アミ ノ酸) を欠損させた可溶型GPC3タンパク質を作製した。

【0135】

完全長ヒトGPC3 cDNAを鋳型としてアンチセンスプライマー (ATA GAA TTC CAC CAT GGC CGG GAC CGT GCG C: 配列番号5) とEcoRI認識配列、Kozak配列を加えたセンスプライマ ー (ATA GGA TCC CTT CAG CGG GGA ATG AAC GTT C: 配列番号6) を用いてPCRを行った。 得られたPCR断片 (1711bp) をpCXND2-Flagにクローニングした。pCXND2-Flagは、pCXN2 (Niwa ら、Gene 1991; 108; 193-199) のHindIII部位にpCHO1 (Hirataら、FEBS letter 1994; 3 56; 244-248) のDHFR遺伝子発現部位を挿入し、また、マルチクローニングサイトの下流 にFlagタグ配列を付加し、Flagタグ付加タンパクとして発現されるよう設計した。作製さ れた発現プラスミドDNAをCHO細胞DXB11株へ導入し、500 μ g/mL Geneticin での選抜によ り、可溶型GPC3高発現CHO株を得た。1700 cm^2 ローラーボトルを用い可溶型GPC3高発現CHO 株の大量培養を行い、培養上清を回収し精製を行った。培養上清をDEAE sepharose Fast Flow (Amersham社) にチャージし、洗浄後、500mM NaClを含むバッファにより溶出した。 次に、Anti-Flag M2 agarose affinity gel (SIGMA社) を用いてアフィニティー精製を行 った。溶出は200 μ g/mLのFLAGペプチドにより行った。Centriprep-10 (Millipore社) による濃縮後、Superdex 200 HR 10/30 (Amersham社) によるゲルろ過を行いFLAGペプチドを除 去した。最後にDEAE sepharose Fast Flowカラムを用いて濃縮し、同時にTween20を含ま ないPBS (500mMのNaClを含む) で溶出を行うことによりバッファ置換を行った。

【実施例3】

【0136】

可溶型GPC3コアタンパク質の作製

GPC3はヘパラン硫酸による修飾を受け巨大分子となる。抗GPC3抗体のスクリーニングに おいてヘパラン硫酸に対する抗体を排除する為、ヘパラン硫酸付加部位に点変異を導入し た可溶型GPC3コアタンパク質を作製し、スクリーニングに用いた。

【0137】

上記可溶型GPC3 (1-563) を鋳型とし、アッセンブリーPCR法によって495番目と509番目 のSerをAlaに置換させたcDNAを作製した。この際、C末端にHisタグが付加されるようにプ ライマーを設計し、得られたcDNAをpCXND3ベクターにクローニングした。pCXND3は、pCXN 2のHindIII部位にpCHO1のDHFR遺伝子発現部位を挿入して作製した。作製された発現プラ スミドDNAをDXB11株へ導入し、500 μ g/mL Geneticin での選抜により、可溶型GPC3コアタ ンパク質高発現CHO株を得た。

【0138】

1700 cm^2 ローラーボトルを用い大量培養を行い、培養上清を回収し精製を行った。培養 上清をQ sepharose Fast Flow (Amersham社) にチャージし、洗浄後、500mM NaClを含むリ

ン酸バッファにより溶出した。次に、Chelating sepharose Fast Flow (Amersham社) を用いてアフィニティー精製を行った。10~150mMのイミダゾールでグラジエント溶出を行った。最後にQ sepharose Fast Flow を用いて濃縮し、500mM NaClを含むリン酸バッファにより溶出した。

【0139】

還元条件下にてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、70kDa、40kDa、30kDaの3つのバンドが得られた。ABI492 protein sequencer (Applied Biosystems社) を用いてアミノ酸シーケンスを行った結果、30kDaのバンドはGPC3の359番目以降、もしくは375番目以降のアミノ酸配列と一致し、GPC3はArg358とSer359の間、若しくはLys374とVal375の間で切断を受け、40kDaのN末端断片と30kDaのC末端側断片に分割していることが判明した。

【実施例4】

【0140】

全長ヒトGPC3発現CHO細胞の作製

フローサイトメトリを用いた結合活性評価用の細胞株を得るために、全長GPC3を発現するCHO細胞の樹立を行った。

【0141】

10 μ gの全長ヒトGPC3遺伝子発現ベクターと60 μ LのSuperFect (QIAGEN社) を混合し、複合体を形成させた後に、CHO細胞DXB11株に添加することにより、遺伝子導入を行った。CO₂インキュベーターで24時間培養後、終濃度0.5mg/mLのGeneticinおよび10% FBSを含む α MEM (GIBCO BRL社) を用いて、選抜を開始した。得られたGeneticin耐性コロニーを集め、限界希釈法により細胞のクローニングを行った。それぞれの細胞クローンを可溶化し、抗GPC3抗体を用いたウエスタンブロットにより全長ヒトGPC3の発現を確認し、安定発現細胞株を取得した。

【実施例5】

【0142】

ELISAによる結合活性の評価

可溶型GPC3コアタンパク質を1 μ g/mLとなるようにコーティングバッファ (0.1mol/L NaHCO₃ (pH9.6), 0.02% (w/v) NaN₃) で希釈したものをイムノプレートに加え、4℃にて一晩放置しコーティングした。希釈バッファ (50 mmol/L Tris-HCl (pH8.1), 1 mmol/L MgCl₂, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.02% (w/v) NaN₃, 1% (w/v) BSA) にてブロッキング処理を行った後、抗GPC3抗体を加え、室温で1時間放置した。リンスバッファ (0.05% (v/v) Tween 20, PBS) にて洗浄後、アルカリホスファターゼ標識した抗マウスIgG抗体 (ZYMED社) を加え、室温で1時間放置した。リンスバッファにて洗浄後、SIGMA104 (SIGMA社) を1 mg/mLとなるように基質バッファ (50mmol/L NaHCO₃ (pH9.8), 10 mmol/L MgCl₂) に希釈したものを添加し、室温で1時間発色させた後、Benchmark Plus (BIO-RAD) を用いて吸光度 (405nm, 参照波長655nm) を測定した。

【実施例6】

【0143】

可溶型GPC3の免疫およびハイブリドーマの選抜

ヒトGPC3とマウスGPC3のホモロジーはアミノ酸レベルで94%の高い相同性を示すため、通常のマウスに免疫しても抗GPC3抗体を得難い可能性を考え、自己免疫疾患マウスであるMRL/MpJ UmmCrj-lpr/lprマウス (以下、MRL/lprマウス、日本チャールズ・リバーより購入) を免疫動物として用いた。7週齢、もしくは8週齢より免疫を開始し、初回免疫には可溶型GPC3を100 μ g/headとなるように調製し、フロイント完全アジュバント (FCA、ベクトンディッキンソン社) を用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。2週間後に50 μ g/headとなるように調製したものをフロイント不完全アジュバント (FIA、ベクトンディッキンソン社) でエマルジョン化したものを皮下に投与した。以降1週間間隔で追加免疫を合計5回行った。その内2匹に対し、最終免疫として50 μ g/headとなるようにPBSに希釈し尾静脈内に投与した。最終免疫の4日後、脾臓細胞を摘出し、マウスミエローマ細胞P3-X

63Ag8U1 (P3U1、ATCCより購入)と2:1になるように混合し、PEG1500 (ロシュ・ダイアグノスティック社)を徐々に加える事により細胞融合を行った。慎重にRPMI1640培地 (GIBCO BRL社)を加えPEG1500を希釈し、遠心操作によりPEG1500を除去した後、10%FBS入りRPMI1640にて懸濁したものを100 μ L/ウェルとなるように96穴培養プレートに播種した。翌日、100 μ L/ウェルとなるように10%FBS、1 x HAT media supplement (SIGMA社)、0.5 x BM-Condimed H1 Hybridoma cloning supplement (ロシュ・ダイアグノスティック社)を含むRPMI1640 (以降、HAT培地)を添加した。2, 3, 5日後に培養液の半分をHAT培地に置き換え、7日後の培養上清を用いてスクリーニングを行った。スクリーニングは可溶型GPC3コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いたELISAにより行った。陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した。その結果、GPC3に対して強い結合活性を有する抗体を11クローン (M3C11、M13B3、M1E7、M3B8、M11F1、L9G11、M19B11、M6B1、M18D4、M5B9、M10D2)取得した。

【実施例7】

【0144】

抗GPC3抗体のアイソタイプの決定、および精製

アイソタイプは、Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (PIERCE社)を用いた抗原依存的ELISAにより決定した。抗体の精製は、FBS(Ultra low IgG) (GIBCO BRL社)を添加したHAT培地にて培養したハイブリドーマの培養上清を、Hi Trap ProteinG HP (Amersham社)に吸着させた後、結合バッファ (20mM Sodium phosphate (pH7.0))にて洗浄後、溶出バッファ (0.1M Glycin-HCl (pH2.7))で溶出した。溶出液は直ちに中和バッファ (1M Tris-HCl (pH9.0))で中和した。PBSで一昼夜透析を行いバッファ置換した。

【実施例8】

【0145】

ELISAによる結合活性の評価

取得された抗GPC3抗体の結合活性を簡便に評価する為、可溶型GPC3コアタンパク質を固相化したイムノプレートに対する抗体濃度依存的な結合を検出した。精製抗体を10 μ g/mLから3倍ずつ12段階に希釈したものを加え、2次抗体として抗マウスIgG抗体を添加し、SIGMA104による発色を行った。発色の程度は発色時間により変化するので、データは正確に1時間後に測定したものを解析した。各抗体は全て濃度依存的な発色を示した。抗体濃度と発色の程度との相関をプロットし、解析ソフトGraphPad Prismを用いて近似曲線を作成し、そのEC50値を結合活性の指標として決定した。図16に全クローンのEC50値を示した。

【実施例9】

【0146】

フローサイトメトリによる結合活性の評価

1mM EDTA pH8.0 (GIBCO社)/PBSにて細胞を剥離し、1x10⁶細胞/mLになるようにFACS バッファ (1% FBS/PBS)に懸濁した。100 μ L/ウェルとなるようにMultiscreen - HV Filter Plates (Millipore社)に分注し、遠心操作にて上清を除去した。適当な濃度に希釈した抗GPC3抗体を加え、氷上にて30分間反応させた。細胞をFACS バッファにて1回洗浄し、FITC標識抗マウスIgG抗体を添加し、氷上にて30分間反応させた。反応後、500rpmで1分間遠心し、上清を除き、FACS バッファ 400 μ Lに懸濁し、フローサイトメトリーに供した。フローサイトメーターはEPICS ELITE ESP (Beckman Coulter)を用いた。前方散乱光 (forward scatter) および側方散乱光 (side scatter) のヒストグラムにて生細胞集団にゲートを設定した。図1に示すように抗GPC3抗体 (M3C11、M11F1) はGPC3を発現させたCHO細胞に強く結合し、親株であるCHO細胞には結合しないことから、細胞膜上に提示されたGPC3に特異的に結合する事が判明した。また、肝癌細胞株であるHepG2 (ATCCより購入)、HuH-7 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入)に対して結合を示したことから、肝細胞癌を特異的に認識する可能性が示された。可溶型GPC3免疫マウス由来クローンのフローサイトメトリによる結合活性については抗体濃度5 μ g/mLにおけるヒストグラムのX-mode値を図16に示す。

【実施例 10】

【0147】

競合ELISAによるエピトープ分類

得られた抗体についてエピトープによる分類を行う為、競合ELISAを実施した。抗体のビオチン化はBiotin Labeling Kit (Roche社)を用いて行った。可溶性GPC3コアタンパク質を $1\mu\text{g/mL}$ となるようにコーティングバッファで希釈したものを $100\mu\text{L}$ /ウエルとなるように加え、一晚 4°C で保管しコーティングした。翌日 $200\mu\text{L}$ の基質バッファを加えブロッキングを行った。 4°C で一晩以上放置したプレートへ抗GPC3抗体を $100\mu\text{L}$ /ウエルとなるように加え、室温で1時間反応させた。その後プレートの洗浄なしに $10\mu\text{g/mL}$ のビオチン標識した抗GPC3抗体 $10\mu\text{L}$ を加えさらに1時間反応させた。 $300\mu\text{L}$ /ウエルのリンスバッファで3回洗浄し、希釈バッファで1000倍に希釈したAP-ストレプトアビジンコンジュゲート (ZYMED社)を $100\mu\text{L}$ /ウエルとなるように加え、室温で1時間反応させた。 $300\mu\text{L}$ /ウエルのリンスバッファで5回洗浄し、SIGMA104を 1mg/mL となるように基質バッファで希釈したものを $100\mu\text{L}$ /ウエルとなるように加えた。1時間室温でインキュベートした後、吸光度 (405nm , 参照波長 655nm) を測定した。

【0148】

図2に競合ELISAの結果を示す。ビオチン化抗体の結合を50%以上競合的に阻害した抗体については、エピトープが立体的に近傍であると判断した。8種類のビオチン化抗体の結合に対する競合的な発色の阻害のパターンによりグループ分けした結果、可溶性GPC3免疫マウス由来の11クローンは5つのグループ (a, b, c, d, e) に分類された (図16)。

【実施例 11】

【0149】

ウエスタンブロッティングによるエピトープ分類

可溶性GPC3コアタンパク質を還元条件下にて10%SDS-PAGE mini (TEFCO社) にチャージし電気泳動後、Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD社)を用いてイモビロン-P (Millipore社)へ移した。膜をTBS-T (0.05% Tween20, TBS)で軽く洗った後、5%スキムミルク入りTBS-Tで1時間振とうした。TBS-Tで約10分間振とうした後、1%スキムミルク入りTBS-Tで希釈した各抗GPC3抗体を加え1時間振とうした。TBS-Tで洗った後1%スキムミルク入りTBS-Tで希釈したHRP-抗マウスIgG抗体 (Amersham社)で1時間振とう後、TBS-Tで洗った。発色はECL-Plus (Amersham社)を用いて行い、Hyperfilm ECL (Amersham社)を用いて現像した。

【0150】

図3に示すように、L9G11は 40kDa 付近のバンドに結合することからN端側結合抗体であると判断された。M3C11は 30kDa 付近のバンドに結合することからC端側に結合する抗体と判断した。競合ELISAでc, d, eに属する抗体は全てN末端に結合し、a, bは全てC末端に結合した (図16)。L9G11は他のN端側結合抗体と比較してウエスタンブロッティングの検出感度が高く、N端側断片をウエスタンブロッティングにより検出するにあたって有用な抗体であると考えられた。

【実施例 12】

【0151】

分泌型GPC3の検出

GPC3が358番目のアミノ酸部位、若しくは374番目のアミノ酸部位で切断される事実を見出し、可溶性GPC3が肝癌患者の血中に分泌されるという仮説を立てた。そこで分泌型GPC3を検出する為、GPC3サンドイッチELISA系を構築した。

【0152】

イムノプレートに $10\mu\text{g/mL}$ となるように抗GPC3抗体をコートし、基質バッファを用いてブロッキングを行った。室温で数時間後、あるいは 4°C で一晩保管後、HepG2の培養上清を加え1時間室温でインキュベートした。 $300\mu\text{L}$ /ウエルのリンスバッファで3回洗浄後、 $10\mu\text{g/mL}$ となるように希釈したビオチン標識した抗GPC3抗体を加え1時間室温でインキュベートした。 $300\mu\text{L}$ /ウエルのリンスバッファで3回洗浄後、AP-ストレプトアビジンを加え

、1時間室温でインキュベートした。300 μ L/ウェルのリンスバッファで5回洗浄した後、添付のプロトコールに従いAMPAK (DAKO社)を用いて発色させ、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。N端断片に結合する抗体 (M6B1、M19B11、M18D4) とC端断片に結合する抗体 (M3C11、M13B3、M3B8) を組み合わせ5種類のサンドイッチELISA系を構築した。いずれの組み合わせも可溶型GPC3を用いたスタンダード曲線では同等の感度を示した。HepG2の培養上清を用いて評価した結果、N端断片に結合する抗体の組み合わせで1 μ g/mL程度と高濃度で分泌型GPC3が検出された (図4)。C端に結合する抗体の組み合わせでは検出濃度が低かったことから、分泌型GPC3はN端断片が優位であると考えられた。

【0153】

次に、抗GPC3抗体を用いてHepG2の培養上清の免疫沈降を行い、分泌型GPC3の検出を行った。N端断片に結合するM10D2を用いた場合、40kDaの分泌型GPC3が検出された (図5)。それに対しC端断片に結合するM1E7を用いた場合、分泌型GPC3は検出されなかった。取得した全GPC3抗体について免疫沈降実験を行った結果、N端断片に結合する全ての抗体は分泌型GPC3を強く検出し、C端断片に結合する抗体では検出されないか、弱く検出された (図16)。免疫沈降により分泌型GPC3を検出し得る抗体は肝細胞癌の診断用抗体として有用であると考えられる。また、分泌型GPC3を検出しにくい抗体は、ADCC活性、CDC活性を有する治療用抗体として開発する上で、血清中の分泌型GPC3にトラップされずに肝細胞癌へ移行し得る点で有用であると考えられた。

【実施例13】

【0154】

抗GPC3抗体可変領域のクローニング

抗GPC3抗体産生ハイブリドーマより抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN社)を用いて1 \times 10⁷細胞のハイブリドーマより抽出した。1 μ gのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社)、以下の合成オリゴヌクレオチド:

マウスIgG1定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG1

GGG CCA GTG GAT AGACAG ATG (配列番号7)

マウスIgG2a定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG2a

CAG GGG CCA GTG GAT AGA CCG ATG (配列番号8)

マウスIgG2b定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG2b

CAG GGG CCA GTG GAT AGA CTG ATG (配列番号9)

またはマウス κ 鎖定常領域塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドkappa

GCT CAC TGG ATG GTG GGA AGA TG (配列番号10)

を用い、5'末端側遺伝子断片を増幅した。

【0155】

逆転写反応は42℃で1時間30分間反応した。PCR溶液50 μ Lは、5 μ Lの10 \times Advantage 2 PCR Buffer、5 μ Lの10 \times Universal Primer A Mix、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 μ Lの Advantage 2 Polymerase Mix (以上、CLONTECH社製)、2.5 μ Lの逆転写反応産物、10 pmoleの合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG1、MHC-IgG2a、MHC-IgG2bまたはkappaを含有し、94℃の初期温度にて30秒間そして94℃にて5秒間、72℃にて3分間のサイクルを5回反復し、94℃にて5秒間、70℃にて10秒間、72℃にて3分間のサイクルを5回反復し、さらに94℃にて5秒間、68℃にて10秒間、72℃にて3分間のサイクルを25回反復した。最後に反応産物を72℃で7分間加熱した。各PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングし、塩基配列を決定した。

【0156】

M3C11、M13B3、M1E7、M3B8、M11F1、M19B11、M6B1、M18D4、M5B9、M10D2、L9G11のH鎖可変領域の塩基配列をそれぞれ配列番号11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21に、アミノ酸配列をそれぞれ配列番号22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32に、L鎖可変領域の塩基配列を配列番号33、

34、35、36、37、38、39、40、41、42、43に、アミノ酸配列をそれぞれ配列番号44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54に示す。

【実施例14】

【0157】

GST融合蛋白を用いたエピトープ分類

C端断片に結合する抗体についてはエピトープの詳細な解析を行う為、段階的に短くしたGPC3C端断片ペプチドとGSTの融合タンパク質GC-1 (Ser495からLys563)、GC-2 (Gly510からLys563)、GC-3 (Ala524からLys563) GC-4 (Gly537からLys563)、GC-5 (Ser550からLys563) を作製した。GPC3 C末端配列をpGEX-4T-3 (Amersham社) ヘクローニングしGSTのC末端側にGPC3 C末端配列を連結したプラスミドDNAを構築した。プラスミドDNAをDH5 α へ導入し形質転換体を得、対数増殖期にある形質転換体に1mMとなるようにIPTGを加えることによりGST融合タンパク質の発現を誘導し、2時間培養後に菌体を回収した。超音波処理により破碎後、XL-80 超遠心分離機(Beckman, ロータ 70.1Ti)を用い35,000rpmで30分遠心後の培養上清を回収し、GST Purification Modules (Amersham社)を用いて精製した。このようにして精製したGST融合タンパク質を還元条件下にてSDS-PAGEにより分離後、抗GPC3抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った(図6)。M3C11、M1E7はGC-1、2を検出し、GC-3、4、5を検出しなかった。これら抗体のエピトープは、GC-2の領域に含まれており、GC-3の領域では不十分な領域であるといえる。M3B8、M1F1はGC-1、2、3、4を検出し、GC-5を検出しなかった。これら抗体のエピトープは、GC-4の領域に含まれており、GC-5の領域では不十分な領域であるといえる。各抗体の結合し得るGST融合蛋白の最小領域について図16のウエスタンブロッティングの項に記載した。

【実施例15】

【0158】

抗GPC3抗体マウスーヒトキメラ抗体の作製

抗GPC3抗体のH鎖およびL鎖可変領域配列をヒトIgG1および κ 鎖定常領域配列に連結した。各抗体のH鎖可変領域の5'末端側塩基配列に相補的でコザック配列を有する合成オリゴヌクレオチドおよびNheI部位を有する3'末端側塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をヒトIgG1定常領域がpBluescript KS+ベクター(東洋紡社)に挿入されているpB-CHベクターにクローニングした。NheI部位により、マウスH鎖可変領域とヒトH鎖(γ 1鎖)定常領域が連結している。作製されたH鎖遺伝子断片を発現ベクターpCXND3にクローニングした。また、各抗体のL鎖可変領域の5'末端側塩基配列に相補的でコザック配列を有する合成オリゴヌクレオチドおよびBsiWI部位を有する3'末端側塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をヒトkappa鎖定常領域がpBluescript KS+ベクター(東洋紡社)に挿入されているpB-CLベクターにクローニングした。BsiWI部位により、ヒトL鎖可変領域と定常領域が連結している。作製されたL鎖遺伝子断片を発現ベクターpUCAGクローニングした。本ベクターpUCAGは、pCXN (Niwaら、Gene 1991;108:193-200)を制限酵素BamHIで消化して得られる2.6kbpの断片をpUC19ベクター(東洋紡社)の制限酵素BamHI部位に連結し、クローニングしたベクターである。

【0159】

抗GPC3マウスーヒトキメラ抗体発現ベクターを作製するために、L鎖遺伝子断片が挿入されたpUCAGベクターを制限酵素HindIII(宝酒造社)で消化して得られる遺伝子断片をH鎖遺伝子が挿入されたpCXND3の制限酵素HindIII切断部位に連結し、クローニングした。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、抗GPC3マウスーヒトキメラ抗体遺伝子を発現する。

【0160】

CHO細胞(DG44株)を用いた安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。Gene Pulser II (Bio Rad社製)を用いた電圧ポレーション法により遺伝子導入した。25 μ gの各抗GPC3マウスーヒトキメラ抗体発現ベクターとPBSに懸濁したCHO細胞(1×10^7 細

胞／m l) の0.75mlを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement (Invitrogen社) を1倍濃度で含むCHO-S-SFM II培地 (Invitrogen社) 40mLに懸濁した。同様の培地で50倍希釈溶液を作製し、96ウェル培養用プレートに100 μ l／ウェルで分注した。CO₂インキュベーター (5%CO₂) で24時間培養後、Geneticin (Invitrogen社) を0.5mg/mLになるように添加して2週間培養した。Geneticin耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中のIgG量について以下に示す濃度定量法で測定した。高産生細胞株を順次拡大培養し、抗GPC3マウスーヒトキメラ抗体安定発現細胞株を取得し、大量培養を行い、培養上清を得た。各抗GPC3マウスーヒトキメラ抗体の精製は、Hi Trap ProteinG HP (Amersham社) を用いて行った。

【実施例16】

【0161】

補体依存性細胞障害活性(CDC活性)の測定

16.1 ヒトアルブミン・ベロナール・バッファ (HAVB) の作製

NaCl (特級、和光純薬工業株式会社) 12.75 g、Na-バルビタール (特級、和光純薬工業株式会社) 0.5625 g、バルビタール (特級、和光純薬工業株式会社) 0.8625 gをミリQ水に溶解し200 mLとした後、オートクレーブ処理 (121℃、20分間) した。オートクレーブ処理した100 mLの温ミリQ水を加え、pH7.43を確認した (推奨pH7.5)。これを5×ベロナールバッファとした。CaCl₂・2H₂O (特級、純正化学株式会社) 0.2205 gを50 mLミリQ水に溶解し0.03 mol/Lとし、CaCl₂溶液とした。MgCl₂・6H₂O (特級、純正化学株式会社) 1.0165 gを50 mLミリQ水に溶解し0.1 mol/Lとし、MgCl₂溶液とした。5×ベロナールバッファ100 mL、ヒト血清アルブミン (ブミネート (登録商標) 25%、ヒト血清アルブミン濃度250 mg/mL、バクスター株式会社) 4 mL、CaCl₂溶液2.5 mL、MgCl₂溶液 2.5 mL、KCl (特級、純正化学株式会社) 0.1 g、グルコース (D(+)-グルコース、ブドウ糖無水、特級、和光純薬工業株式会社) 0.5 gをミリQ水に溶解し500 mLとした。これをHAVBとした。ろ過滅菌後、設定温度5℃にて保存した。

【0162】

16.2 標的細胞の調製

実施例4で作製された全長ヒトGPC3発現CHO細胞は、10%FBSと0.5mg/mL Geneticin (GIBCO) を添加した α -MEM核酸 (+) 培地 (GIBCO) で培養し、細胞剥離緩衝液 (Invitrogen Corp) を用いてディッシュから剥離して、96ウェル平底プレート (Falcon) の各ウェルに1 \times 10⁴細胞/ウェルで分注し、3日間培養した。培養後、5.55MBqのクロム-51を加え、5%炭酸ガスインキュベーター中37℃ 1時間培養し、この細胞をHAVBで2回洗浄し、50 μ LのHAVBを加え標的細胞とした。

【0163】

16.3 クロム遊離試験 (CDC活性)

各キメラ抗体をHAVBで希釈して40 μ g/mLの抗体溶液とした。標的細胞に抗体溶液を50 μ Lずつ添加し、氷上にて15分間静置した。続いて、各ウェルにHAVBにて希釈した、健常者ボランティア末梢血由来ヒト血清を終濃度25%になるよう100 μ Lずつ添加し (抗体の終濃度10 μ g/mL)、5%炭酸ガスインキュベーター中に37℃で90分間静置した。プレートを遠心分離後、各ウェルより上清を100 μ Lずつ回収し、ガンマカウンターにて放射活性を測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率 (\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

Aは各ウェルにおける放射活性 (cpm)、Bは標的細胞に2% NP-40水溶液 (Nonidet P-40、Code No. 252-23、ナカライテスク株式会社) を100 μ L、HAVBを50 μ L添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値、Cは標的細胞にHAVBを150 μ L添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値を示す。試験は三重に行い、CDC活性 (%) について平均値および標準偏差を算出した。

【0164】

その結果を図7に示した。9種類の抗GPC3キメラ抗体のうち、C末端認識抗体であるM3B8とM11F1がGPC3発現CHO細胞に対し強いCDC活性を示したのに対し、その他の抗体ではCDC活性が認められなかった。M3B8とM11F1はCompetition ELISAにおいて「b」と呼ばれるグループに属しており、強いCDC活性を示すのに重要なエピトープを見出す事ができた。

【実施例17】

【0165】

ヒト末梢血由来PBMCを用いたADCC活性の測定

17.1 ヒトPBMC溶液の調製

健常人よりヘパリン加採血した末梢血を、PBS(-)で2倍に希釈し、Ficoll-Paque TM PLUS (Amersham社)に重層した。これを遠心(500×g、30分間、20℃)した後、単核球画分である中間層を分取した。3回洗浄後、10% FBS/RPMIに懸濁し、ヒトPBMC溶液とした。

【0166】

17.2 標的細胞の調製

10%FBS/RPMI1640培地で培養したHepG2細胞を、トリプシン-EDTA(Invitrogen社)を用いてディッシュから剥離し、96ウェルU字底プレート(Falcon)の各ウェルに 1×10^4 細胞/ウェルで分注し、2日間培養した。実施例4で作製された全長ヒトGPC3発現CHO細胞は、10%FBSと0.5mg/mL Geneticin(GIBCO)を添加した α -MEM核酸(+)培地(GIBCO)で培養し、細胞剥離緩衝液(Invitrogen Corp)を用いてディッシュから剥離して、96ウェル平底プレート(Falcon)の各ウェルに 1×10^4 細胞/ウェルで分注し、3日間培養した。両細胞は培養後、それぞれ5.55MBqのクロム-51を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃で1時間培養し、この細胞を培地で1回洗浄し、50 μ Lの10% FBS/RPMI1640培地を加え標的細胞とした。

【0167】

17.3 クロム遊離試験(ADCC活性)

標的細胞に各濃度に調製した抗体溶液50 μ Lを添加し、氷上で15分反応させた後に、ヒトPBMC溶液100 μ L(5×10^5 細胞/ウェル)を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃4時間培養し、培養後、プレートを遠心分離し、培養上清100 μ L中の放射活性をガンマカウンターで測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率(\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

Aは各ウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、Bは標的細胞に2% NP-40水溶液(Nonidet P-40、Code No.252-23、ナカライテスク株式会社)を100 μ L、10%FBS/RPMI培地を50 μ L添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、Cは標的細胞に10%FBS/RPMI培地を150 μ L添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。試験は三重に行い、ADCC活性(%)について平均値および標準偏差を算出した。その結果を図8に示した。9種類の抗GPC3キメラ抗体のうち、C末端認識抗体で強いADCC活性を示す傾向が認められた。

【実施例18】

【0168】

GC-3の免疫およびハイブリドーマの選抜

得られた抗GPC3抗体のうち、M11F1、M3B8のみが強いCDC活性を示したことから、CDC活性にはエピトープ依存性があることが判明した。ADCC活性、CDC活性を併せもつ抗体の取得を目的とし、M11F1、M3B8のエピトープを含むGST融合タンパク質であるGC-3の免疫を行った。GC-3は上記方法により大量に精製し、Superdex75 (Amersham社)を用いてゲルろ過を行い、バッファをPBSに置換したものを免疫蛋白として使用した。Balb/c (日本チャールズリバーより購入)3匹、MRL/lpr 3匹に対し、上記方法に従いGC-3の免疫を行った。初回免疫にはGC-3を100 μ g/headとなるように調製し、FCAを用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。2週間後に50 μ g/headとなるように調製したものをFIAでエマルジョン化したものを皮下に投与した。5回免疫の後、全マウスに対し最終免疫(50 μ g/head)を尾静脈内に行い細胞融合を行った。スクリーニングは可溶型GPC3コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いたELISAにより行った。陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した。その結果、GPC3に対して強い結合活性を有する抗体を5クローン(GC199、GC202、GC33、GC179、GC194)取得した。

【0169】

ハイブリドーマの培養上清よりHi Trap ProteinG HPを用いて精製抗体を得た。取得された抗体については、上記方法に従い解析を行った。可溶型GPC3コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いたELISAによりEC50値を算出し、フローサイトメトリにより5 μ g/mLでのヒストグラムのX-mode値を測定した(図17)。競合ELISAによるエピトープ分類の結果、bに属するもの(GC199、GC202、GC33)と新しいエピトープグループI(GC179、GC194)に分類された。GST融合タンパク質を用いたエピトープ分類の結果、GC199、GC202、GC33はGC-1、2、3、4を検出し、GC-5を検出しなかった。これら抗体のエピトープは、M11F1、M3B8のエピトープと同様に、GC-4の領域に含まれており、GC-5の領域では不十分な領域であるといえる。GC179、GC194はGC-1、2、3を検出し、GC-4、5を検出しなかった。これら抗体のエピトープは、GC-3の領域に含まれており、GC-4の領域では不十分な領域であるといえる。各抗体の結合し得るGST融合蛋白の最小領域について図17のウエスタンブロッティングの項に記載した。

【0170】

GC199、GC202、GC33、GC179、GC194について上記方法に従いH鎖、L鎖の可変領域をクローニングし、配列を決定した。GC194のL鎖については2種類の配列がクローニングされた。GC199、GC202、GC33、GC179、GC194のH鎖可変領域の塩基配列をそれぞれ配列番号55、56、57、58、59に、アミノ酸配列をそれぞれ配列番号60、61、62、63、64に示す。GC199、GC202、GC33、GC179、GC194(1)、GC194(2)のL鎖可変領域の塩基配列をそれぞれ配列番号65、66、67、68、69、70に、アミノ酸配列をそれぞれ配列番号71、72、73、74、75、76に示す。

【0171】

さらに、既知の抗体のアミノ酸配列のデータベースと比較して相同性を調べることにより、CDR領域を以下のとおり決定した。

【表 1】

抗体	CDR	アミノ酸配列	配列 番号
M13B3(H)	CDR1	NYAMS	103
	CDR2	AINNNGDDTYYLDTVKD	104
	CDR3	QGGAY	105
M3B8(H)	CDR1	TYGMGVG	106
	CDR2	NMWYDAKYNSDLKS	107
	CDR3	MGLAWFAY	108
M11F1(H)	CDR1	IYGMGVG	109
	CDR2	NMWNDCKYYNSALKS	110
	CDR3	IGYFYFDY	111
M5B9(H)	CDR1	GYWMH	112
	CDR2	AIYPGNSDTNYNQKFKG	113
	CDR3	SGDLTGGLAY	114
M6B1(H)	CDR1	SYAMS	115
	CDR2	AINSNGGTTYYPDTMKD	116
	CDR3	HNGGYENYGWFAY	117
M10D2(H)	CDR1	SYWMH	118
	CDR2	EIDPSDSYTYYNQKFRG	119
	CDR3	SNLGDGHYRFPAPY	120
L9G11(H)	CDR1	SYWMH	118
	CDR2	TIDPSDSETHYNLQFKD	121
	CDR3	GAFYSSYSYWAUFAY	122
GC33(H)	CDR1	DYEMH	123
	CDR2	ALDPKTGDTAYSQKFKG	124
	CDR3	FYSYTY	125
GC179(H)	CDR1	INAMN	126
	CDR2	RIRSESNNYATYYGDSVKD	127
	CDR3	EVTTSFAY	128
GC194(H)	CDR1	ASAMN	129
	CDR2	RIRSKSNNYAIYYADSVKD	130
	CDR3	DPGYGPNPWFAY	131
GC199(H)	CDR1	DYSMH	132
	CDR2	WINTETGEPTYADDFKG	133
	CDR3	LY	134
GC202(H)	CDR1	TYGMGVG	106
	CDR2	NMWHDCKYYNSALKS	135
	CDR3	IAPRYNKYEGFFAF	136

【 0 1 7 2 】

【表 2】

M13B3(L)	CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN	137
	CDR2	LVSKLDS	138
	CDR3	WQGTHFPLT	139
M3B8(L)	CDR1	KASQDINNYLS	140
	CDR2	RANRLVD	141
	CDR3	LQCDEFPPWT	142
M11F1(L)	CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	143
	CDR2	KVSNRFS	144
	CDR3	SQSTHVPWT	145
M5B9(L)	CDR1	RSSKSLLHSNGITYLY	146
	CDR2	QMSNLAS	147
	CDR3	AQNLELPYT	148
M6B1(L)	CDR1	KASQDINKNII	149
	CDR2	YTSTLQP	150
	CDR3	LQYDNLPRT	151
M10D2(L)	CDR1	RASHSISNFLH	152
	CDR2	YASQSI	153
	CDR3	QQSNWSLT	154
L9G11(L)	CDR1	RASESVEYYGTSLMQ	155
	CDR2	GASNVE	156
	CDR3	QQSRKVPYT	157
GC33(L)	CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	143
	CDR2	KVSNRFS	144
	CDR3	SQNTHVPPT	158
GC179(L)	CDR1	KSSKSLLHSNGNTYLN	159
	CDR2	WMSNLAS	160
	CDR3	MQHIEYPFT	161
GC194(L)1	CDR1	RSSKSLLHSYDITYLY	162
	CDR2	QMSNLAS	147
	CDR3	AQNLELPPT	163
GC194(L)2	CDR1	SASSSVSYMY	164
	CDR2	DTSNLAS	165
	CDR3	QQWSSYPLT	166
GC199(L)	CDR1	KSSQSLLHSDGKTFLN	167
	CDR2	LVSRLDS	168
	CDR3	CQGTHFPRT	169
GC202(L)	CDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE	170
	CDR2	KVSNRFS	144
	CDR3	FQGSHPWT	171

【実施例 19】

【0173】

マウス骨髄由来エフェクター細胞を用いたADCC活性の測定

19. 1 マウス骨髄由来エフェクター細胞溶液の調製

SCIDマウス（日本クレア・オス・10週齢）の大腿骨から骨髄細胞を採取し、10% FBS/RPMI 1640培地中 5×10^5 個/mLとなるよう懸濁し、マウスGM-CSF (PeproTech) およびヒトIL-2 (PeproTech)をそれぞれ10ng/mL、50ng/mLとなるよう添加し、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃で5日培養した。培養後スクレーパーではがして培地で1回洗浄し、10% FBS/RPMI 1640培地中 5×10^6 /mLとなるよう懸濁し、マウス骨髄由来エフェクター細胞溶液とした。

【0174】

1.9.2 標的細胞の調製

ヒト肝癌細胞株HuH-7は10%FBS (ThermoTrace社製) を含むDMEM培地 (SIGMA社製) にて維持継代し、Cell Dissociation Buffer (Invitrogen社) を用いてディッシュから剥離し、96ウェルU字底プレート (Falcon) の各ウェルに 1×10^4 細胞/ウェルで分注し、1日間培養した。培養後、5.55MBqのクロム-51を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃で1時間培養し、この細胞を培地で1回洗浄し、50 μ Lの10%FBS/RPMI1640培地を加え標的細胞とした。

【0175】

1.9.3 クロム遊離試験 (ADCC活性)

標的細胞に各濃度に調製した抗体溶液50 μ Lを添加し、氷上で15分反応させた後に、マウス骨髄由来エフェクター細胞溶液100 μ L (5×10^5 細胞/ウェル) を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃4時間培養し、培養後、プレートを遠心分離し、培養上清100 μ L中の放射活性をガンマカウンターで測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

特異的クロム遊離率 (%) = $(A-C) \times 100 / (B-C)$

Aは各ウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値、Bは標的細胞に2% NP-40水溶液 (Nonidet P-40、Code No. 252-23、ナカライテスク株式会社) を100 μ L、10%FBS/RPMI培地を50 μ L添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値、Cは標的細胞に10%FBS/RPMI培地を150 μ L添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値を示す。試験は三重に行い、ADCC活性 (%) について平均値および標準偏差を算出した。

【0176】

その結果を図9に示した。GC33抗体は0.1 μ g/mL以上の抗体濃度においてADCC活性を示し、GC179抗体と比較して強い活性を示すことが明らかとなった。

【実施例20】

【0177】

GC33抗体のヒト肝癌移植マウスモデルに対する抗腫瘍活性

2.0.1 ヒト肝癌移植マウスモデルの作製

ヒト肝癌細胞株HuH-7は、DMEM培地とMATRIGEL (BD Bioscience社製) を1:1で含む溶液にて 5×10^7 個/mLになるように調製した。前日に抗アジアロGM1抗体 (和光純薬社製、1バイアルを5mLで溶解) 100 μ Lを腹腔内へ投与したSCIDマウス (オス、5週齢) (日本クレア) の腹部皮下へ上記細胞懸濁液100 μ L (5×10^6 個/マウス) を移植した。

【0178】

2.0.2 抗体調製および投与

ヒト肝癌移植マウスモデルに対し、投与当日にPBS (一) で0.5 mg/mL (5 mg/kg投与群) および0.1 mg/mL (1 mg/kg投与群) になるように調製した抗体溶液を、細胞移植後20日目より、週に1回、3週間、10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。陰性対照として、PBS (一) (Vehicle) を同様に週に1回、3週間、10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。いずれの群も、1群6匹で行った。

【0179】

2.0.3 抗腫瘍効果の評価

GC33抗体のヒト肝癌移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果については腫瘍体積の経時変化および最終投与日より一週間後の腫瘍重量で評価した。腫瘍体積は以下の式にて算出した。

腫瘍体積 = 長径 \times 短径 \times 短径 / 2

その結果、図10に示すとおり、GC33抗体投与群ではVehicle投与群と比較して有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

以上より、GC33抗体がヒト肝癌移植マウスモデルに対して、抗腫瘍効果を有することが示された。

【実施例21】

【0180】

GC33マウスーヒトキメラ抗体の作製

GC33のH鎖、L鎖について、5'末端側塩基配列に相補的でコザック配列、HindIII部位を有する合成オリゴヌクレオチド、および3'末端側塩基配列に相補的でBamHI部位を有する合成オリゴヌクレオチドを用いてPCRを行った。得られたPCR産物をHindIII、BamHI消化後、ヒトIgG1定常領域がクローニングされた発現ベクターHEFg γ 1、およびヒト κ 鎖定常領域がクローニングされた発現ベクターHEFg κ へクローニングした（Satoら、Mol Immunol. 1994; 371-381）。上記方法に従いCHO細胞（DG44株）へ導入し安定発現細胞株を樹立した。培養上清よりHi Trap ProteinG HP（Amersham社）を用いて抗体を精製した。培養上清中のIgG濃度の測定は、ヤギ抗ヒトIgG（BIOSOURCE社）とヤギ抗ヒトIgG アルカリホスファターゼコンジュゲート（BIOSOURCE社）を用いたヒトIgGサンドイッチELISAを行い、市販の精製ヒトIgG（Cappel社）との比較により定量した。

【実施例22】

【0181】

GC33マウスーヒトキメラ抗体を用いたCDC活性、ADCC活性の測定

実施例16および17に記載した方法に従ってGC33、M3C11、およびM1E7マウスーヒトキメラ抗体のCDC活性およびADCC活性測定を行った。標的細胞として、CDC活性は全長GPC3発現CHO細胞を、ADCC活性はHepG2をそれぞれ用いた。それぞれの結果を図11、図12に示す。いずれの実験系においてもGC33は他2抗体と比較して強いCDC活性およびADCC活性を示すことが明らかとなった。

【実施例23】

【0182】

GC33のエピトープ解析

GC33についてはエピトープを詳細に決定するため、さらに短いGPC3C末端ペプチドとGSTの融合タンパク質を作製し、ウエスタンブロッティングにより解析した。作製したGST融合タンパク質に含まれるGPC3由来ペプチド配列を図13に示す。GC33はGC-4 (aa 537-563) に結合し、GC-5 (aa 550-563) に結合できないことから、エピトープがaa 537 - 550の領域を少なくとも一部含む領域であると考えられた。始めにGC-6 (G N S Q Q A T P K D N E I S (配列番号93))、GC-7 (G N S Q Q A T P (配列番号94))、GC-8 (Q Q A T P K D N (配列番号95))、GC-9 (T P K D N E I S (配列番号96)) を作製した。5'端にEcoRI、3'端にSalI認識配列の切断端が付加されるように設計したフォワードオリゴDNAとリバースオリゴDNAを作製した。オリゴDNAはエスベックオリゴ株式会社に合成を委託し、C-18カートリッジ精製され、5'末端リン酸化したものを使用した。10 μ MのフォワードオリゴDNA 25 μ Lと10 μ MのリバースオリゴDNA 25 μ Lを混合し、94 $^{\circ}$ Cで5分間の後、37 $^{\circ}$ Cで10分間、室温で15分間反応させた後、4 $^{\circ}$ Cで10分放置し、フォワードオリゴDNAとリバースオリゴDNAをアニールさせた。吸光度測定により濃度を決定した後、インサート：ベクターのモル比が3:1となるように、EcoRI、SalI消化したpGEX4T-3にクローニングした。塩基配列を確認した後、上記方法に従いIPTGによりGST融合タンパク質の発現を誘導し、Gluthatione Sepharose 4Bを用いて精製した。これを還元条件下にてSDS-PAGEにより分離し、GC33によるウエスタンブロッティングの結果、いずれのGST融合タンパク質も強くは検出できず、GC33による結合はさらにC末端側の配列が必要である事が予想された（図14）。そこで、GC-11 (A T P K D N E I S T (配列番号97))、GC-12 (P K D N E I S T F H (配列番号98))、GC-13 (D N E I S T F H N L (配列番号99))、GC-14 (E I S T F H N L G N (配列番号100)) を作製し同様に評価した結果、GC-11、GC-12、GC-13がGC33により強く結合された。この結果より、GC33はGPC3のC末端544番目から553番目の配列 (P K D N E I S T F H) 内にエピトープが存在すると判断した。

【実施例24】

【0183】

GC33のヒト化

公開されているKabat Database (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>)、およ

びImMunoGeneTics Database (IMGT)より抗体の配列データ入手し、H鎖可変領域、L鎖可変領域に分けてホモロジー検索を行った。その結果、H鎖可変領域はDN13 (Smithsonら、Mol Immunol. 1999; 36: 113-124)と高い相同性を持つことが分かった。また、L鎖可変領域はAccession number AB064105のhomo sapiens IgK mRNA for immunoglobulin kappa light chain VLJ region, partial cds, clone:K64と高い相同性を持つことが分かった。また、L鎖のシグナル配列についてはAB064105と相同性の高いAccession Number S40357のシグナル配列を利用した。これらの抗体のフレームワーク領域(以下、FR)に相補性抗原決定領域(以下、CDR)を移植したヒト化抗体を作製した。

【0184】

具体的には、50base程度の合成オリゴDNAを約20base程度ハイブリダイズするように設計し、これらの合成オリゴDNAをPCR法によりアッセンブリさせて各可変領域をコードする遺伝子を作製した。5'端の合成オリゴDNAの末端に挿入したHindIII配列、および3'端の合成オリゴDNAの末端に挿入したBamHI配列で切断し、ヒトIgG1定常領域がクローニングされた発現ベクターHEFg γ 1、ヒト κ 鎖定常領域がクローニングされた発現ベクターHEFg κ へクローニングした(Satoら、Mol Immunol. 1994; 37:1-381)。このようにして作製したヒト化GC33はH鎖、L鎖それぞれver. aと命名した。H鎖、L鎖ともにver. aのヒト化GC33 (ver. a / ver. a)はマウスGC33可変領域の抗体(mouse / mouse)と比較して結合活性が低かった(図15)。H鎖とL鎖についてマウスGC33配列とver. a配列をキメラに組み合わせた抗体(mouse / ver. a、ver. a / mouse)を作製し結合活性を評価した結果、ver. a / mouseで結合活性の低下が認められ、アミノ酸置換による結合活性の低下はH鎖に起因する事が判明した。そこで、H鎖の改変体ver. c、ver. f、ver. h、ver. i、ver. j、ver. kを作製した。全てのヒト化GC33はマウスGC33可変領域を有するキメラ抗体と同等の結合活性を示した(図15)。ヒト化GC33H鎖可変領域ver. a、ver. c、ver. f、ver. h、ver. i、ver. j、ver. kの塩基配列を配列番号77、78、79、80、81、82、83に、アミノ酸配列を配列番号84、85、86、87、88、89、90に示す。ヒト化GC33L鎖可変領域ver. aの塩基配列を配列番号91に、アミノ酸配列を配列番号92に示す。ヒト化GC33H鎖可変領域ver. i、ver. j、ver. kでは、6番目のグルタミン酸がグルタミンに置換されているが、これらの抗体は熱安定性が顕著に増加していた。

【実施例25】

【0185】

ヒト化GC33L鎖の改変

蛋白質の脱アミド化については一次配列依存的な脱アミド化の反応速度定数が知られており、Asn-Glyが特に脱アミド化し易い配列として知られている(Rocinsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98: 944-949.)。配列番号91に示されるヒト化GC33L鎖ver. a可変領域のCDR1内にあるAsn33については、一次配列がAsn-Glyであることから、脱アミド化が容易に起きやすい配列である事が予想された。

【0186】

Asn33の脱アミド化による結合活性に対する影響を評価する為に、Asn33をAspに置換した改変抗体を作製した。点変異の導入には、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社)を使用した。すなわち、125ngのセンスプライマー(CTT GTA CAC AGT GAC GGA AAC ACC TAT:配列番号172)、125ngのアンチセンスプライマー(ATA GGT G TT TCC GTC ACT GTG TAC AAG:配列番号173)、5 μ Lの10x reaction buffer、1 μ LのdNTP mix、10ngのヒト化GC33L鎖ver. aがクローニングされたHEFg κ 、1 μ LのPfu Turbo DNA Polymeraseを含む50 μ Lの反応液を、95℃で30秒、55℃で1分、68℃で9分からなるサイクルを12回行った。その後制限酵素DpnIを加え37℃で2時間消化したものを添付のXL1-Blueコンピテント細胞に導入し形質転換体を得た。正しく変異の導入されたクローンについて、可変領域を切り出し、再度HEFg κ へクローニングし直した。ヒト化GC33H鎖ver. kがクローニングされたHEFg γ 1と共にFugene6 (Roche社)を用いてCOS7細胞へ導入し一過性に発現させた培養上清を回収した。抗ヒトIgG抗体を用いたサンドイッチELISAにより抗体濃度を定量し、可溶型GPC3コア蛋白質を固相化したELISAにより改変抗体の結合活性を評価

した。図18に示すようにAsn33をAspに置換した改変抗体(N33D)では結合活性が消失しており、Asn33で脱アミド化が起きた場合結合活性に与える影響は大きいと考えられた。

【0187】

Asn33の脱アミド化を抑制する方法として、Gly34を他のアミノ酸に改変する方法が報告されている(W003057881A1)。上記方法に従い、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kitを用いCys、Metを除く他の17アミノ酸に置換した改変抗体G34A、G34D、G34E、G34F、G34H、G34N、G34P、G34Q、G34I、G34K、G34L、G34V、G34W、G34Y、G34R、G34S、G34Tを作製し、COS7細胞一過性発現培養上清を用いて結合活性の評価を行った。その結果、Pro(G34P)、Val(G34V)以外へのアミノ酸置換は結合活性を維持している事が判明した。

【0188】

上述の改変抗体の軽鎖CDR1のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号174(G34A)、配列番号175(G34D)、配列番号176(G34E)、配列番号177(G34F)、配列番号178(G34H)、配列番号179(G34N)、配列番号180(G34T)、配列番号181(G34Q)、配列番号182(G34I)、配列番号183(G34K)、配列番号184(G34L)、配列番号185(G34S)、配列番号186(G34W)、配列番号187(G34Y)、配列番号188(G34R)、配列番号189(G34V)、配列番号190(G34P)に記載する。また、上述の改変抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号191(G34A)、配列番号192(G34D)、配列番号193(G34E)、配列番号194(G34F)、配列番号195(G34H)、配列番号196(G34N)、配列番号197(G34T)、配列番号198(G34Q)、配列番号199(G34I)、配列番号200(G34K)、配列番号201(G34L)、配列番号202(G34S)、配列番号203(G34W)、配列番号204(G34Y)、配列番号205(G34R)、配列番号206(G34V)、配列番号207(G34P)に記載する。

【産業上の利用可能性】

【0189】

本発明の抗体は、細胞増殖抑制剤として、抗癌剤として、あるいは癌の診断薬として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0190】

【図1】図1は、CHO細胞、全長GPC3発現CHO細胞、HepG2、HuH-7に対する抗GPC3抗体の結合活性をフローサイトメトリーにより評価した図である。M1E7(実線)、M11F1(破線)はそれぞれ5 μ g/mL濃度で使用した。

【図2】図2は、競合ELISAによるエピトープ分類の結果を示した表である。ビオチン化した抗GPC3抗体の結合に対する競合的な阻害の程度を%表示し、競合的阻害のパターンに従いaからeまでの5つのグループに分類された。

【図3】図3は、抗GPC3抗体が可溶型GPC3コアタンパク質の40kDaのN端断片に結合するか、30kDaのC端断片に結合するかウエスタンブロッティングにより評価した結果である。L9G11はN端断片に結合し、M3C11はC端断片に結合する事が判明した。

【図4】図4は、HepG2の培養上清中に分泌型GPC3が存在する事をサンドイッチELISAにより検出した結果である。M6B1、M18D4、M19B11等のN端断片に結合する抗体の組み合わせで高度に検出され、M3C11、M13B3、M3B8等のC端断片に結合する抗体では強くは検出されなかった。

【図5】図5は、抗GPC3抗体を用いてHepG2の培養上清の免疫沈降を行い、分泌型GPC3を検出した結果である。コントロールとして培地(レーン1、3)若しくはHepG2の培養上清(レーン2、4)をM1E7(レーン1、2)、M10D2(レーン3、4)を用いて免疫沈降を行った。N端断片に結合するM10D2において分泌型GPC3が検出された。

【図6】図6は、GPC3C末端ペプチドとGSTの融合タンパク質を利用しGPC3C末端断片に結合する抗体のエピトープをウエスタンブロッティングにより明らかにした結果である。可溶型GPC3コアタンパク質(レーン1)、GST(レーン2)、GC-1(レーン3)、GC-2(レーン4)、GC-3(レーン5)、GC-4(レーン6)、GC-5(レーン7)を

還元条件下にてSDS電気泳動後、M3C11、M11F1を用いてウエスタンブロッティングを行った。

【図7】図7は、抗GPC3マウスーヒトキメラ抗体を用いて、GPC3発現CHO細胞に対するCDC活性を評価した結果である。

【図8】図8は、抗GPC3マウスーヒトキメラ抗体を用いて、GPC3発現CHO細胞、およびHepG2に対するADCC活性を評価した結果である。

【図9】図9は、GC33のマウス骨髄由来エフェクター細胞を用いたヒト肝癌細胞株HuH-7に対するADCC活性を評価した結果である。

【図10】図10は、GC33抗体のヒト肝癌移植マウスモデルに対する抗腫瘍活性を評価した結果である。

【図11】図11は、GC33のマウスーヒトキメラ抗体を用いて、GPC3発現CHO細胞に対するCDC活性を評価した結果である。

【図12】図12は、GC33のマウスーヒトキメラ抗体を用いて、HepG2に対するADCC活性を評価した結果である。

【図13】図13は、GC33のエピトープ解析用に作製したGST融合タンパク質（GC-6、7、8、9、10、11、12、13、14）に含まれるGPC3由来配列を示した図である。

【図14】図14は、GST、GC-7、8、9、10、11、12、13、14を還元条件下にてSDS-PAGEにより分離後、GC33を用いてウエスタンブロッティングを行った結果である。

【図15】図15は、ヒト化GC33のGPC3に対する結合活性をELISAにより評価した結果である。

【図16】図16は、可溶型GPC3免疫マウス由来クローンについて、アイソタイプ、ELISA、BIAcore、FACS、エピトープ解析、免疫沈降実験の結果をまとめた抗体パネルである。

【図17】図17は、GC-3免疫マウス由来クローンについて、アイソタイプ、ELISA、FACS、エピトープ解析の結果をまとめた抗体パネルである。

【図18】図18は、ヒト化GC33L鎖可変領域CDR1に位置するGly34をCys、Metを除く他の17アミノ酸に置換した際の、可溶型GPC3コア蛋白質に対する結合活性をELISAにより評価した結果である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
 <120> Anti-Glypican 3 Antibodies
 <130> PCG-0004
 <160> 173
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 1
 gatatcatgg ccggggaccgt gcgcaccgcg t 31
 <210> 2
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 2
 gctagctcag tgcaccagga agaagaagca c 31
 <210> 3
 <211> 1743
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <400> 3
 atggccggga ccgtgcgcac cgcgtgcttg gtgggtggcga tgctgctcag cttggacttc 60
 ccgggacagg cgcagccccc gccgccgccg ccggacgcc a cctgtcacca agtccgctcc 120
 ttcttccaga gactgcagcc cggactcaag tgggtgccag aaactcccg t gccaggatca 180
 gatttgcaag tatgtctccc taagggccca acatgctgct caagaaagat ggaagaaaaa 240
 taccaaactaa cagcaacgatt gaacatggaa cagctgcttc agtctgcaag tatggagctc 300
 aagttcttaa ttattcagaa tgctgcgggt ttccaagagg cctttgaaat tgttggttcgc 360
 catgccaaaga actacaccaa tgccatgttc aagaacaact acccaagcct gactccacaa 420
 gcttttgagt ttgtgggtga atttttcaca gatgtgtctc tctacatctt gggttctgac 480
 atcaatgtag atgacatggc caatgaattg tttgacagcc tgtttccagt catctatacc 540
 cagctaataga acccaggcct gcctgattca gccctggaca tcaatgagtg cctccgagga 600
 gcaagacgtg acctgaaagt atttgggaat tccccaaagc ttattatgac ccagggtttcc 660
 aagtcactgc aagtcactag gatcttccct caggctctga atcttggaat tgaagtgate 720
 aacacaactg atcacctgaa gttcagtaag gactgtggcc gaatgctcac cagaatgtgg 780
 tactgctctt actgccaggg actgatgatg gttaaaccct gtggcggtta ctgcaatgtg 840
 gtcattgcaag gctgtatggc aggtgtggtg gagattgaca agtactggag agaatacatt 900
 ctgtcccttg aagaacttgt gaatggcatg tacagaatct atgacatgga gaacgtactg 960
 cttgggtctct tttcaacaat ccatgattct atccagtatg tccagaagaa tgcaggaaag 1020
 ctgaccacca ctattggcaa gttatgtgcc cattctcaac aacgccaaata tagatctgct 1080
 tatttatcctg aagatctctt tattgacaag aaagtattaa aagttgctca tgtagaacat 1140
 gaagaaacct tatecagccg aagaagggaa ctaattcaga agttgaagtc tttcatcagc 1200
 ttctatagtg ctttgccctgg ctacatctgc agccatagcc ctgtggcgga aaacgacacc 1260
 ctttgctgga atggacaaga actcgtggag agatacagcc aaaaggcagc aagggaatgga 1320
 atgaaaaacc agttcaatct ccatgagctg aaaatgaagg gccctgagcc agtggctcagt 1380

caaattattg	acaaactgaa	gcacattaac	cagctcctga	gaaccatgtc	tatgcccaaa	1440
ggtagagttc	tggataaaaa	cctggatgag	gaaggggttg	aaagtggaga	ctgcggtgat	1500
gatgaagatg	agtgcattgg	aggctctggg	gatggaatga	taaaagtgaa	gaatcagctc	1560
cgccttccttg	cagaaactggc	ctatgatctg	gatgtggatg	atgcgcctgg	aaacagtcag	1620
caggcaactc	cgaaggacaa	cgagataagc	acctttcaca	acctcgggaa	cgttcattcc	1680
ccgctgaagc	ttctcaccag	catggccatc	tcgggtgggtg	gcttcttctt	cctgggtgcac	1740
tga						1743

<210> 4

<211> 580

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Met	Ala	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Ala	Cys	Leu	Val	Val	Ala	Met	Leu	Leu	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Asp	Phe	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp	
			20					25					30			
Ala	Thr	Cys	His	Gln	Val	Arg	Ser	Phe	Phe	Gln	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly	
		35					40					45				
Leu	Lys	Trp	Val	Pro	Glu	Thr	Pro	Val	Pro	Gly	Ser	Asp	Leu	Gln	Val	
	50					55					60					
Cys	Leu	Pro	Lys	Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Ser	Arg	Lys	Met	Glu	Glu	Lys	
65					70					75					80	
Tyr	Gln	Leu	Thr	Ala	Arg	Leu	Asn	Met	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Ser	Ala	
				85					90					95		
Ser	Met	Glu	Leu	Lys	Phe	Leu	Ile	Ile	Gln	Asn	Ala	Ala	Val	Phe	Gln	
			100					105					110			
Glu	Ala	Phe	Glu	Ile	Val	Val	Arg	His	Ala	Lys	Asn	Tyr	Thr	Asn	Ala	
		115					120					125				
Met	Phe	Lys	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Leu	Thr	Pro	Gln	Ala	Phe	Glu	Phe	
	130					135					140					
Val	Gly	Glu	Phe	Phe	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	
145					150					155					160	
Ile	Asn	Val	Asp	Asp	Met	Val	Asn	Glu	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Pro	
			165					170						175		
Val	Ile	Tyr	Thr	Gln	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	
			180					185					190			
Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Leu	Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Phe	
		195					200					205				
Gly	Asn	Phe	Pro	Lys	Leu	Ile	Met	Thr	Gln	Val	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	
	210					215					220					
Val	Thr	Arg	Ile	Phe	Leu	Gln	Ala	Leu	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Val	Ile	
225					230					235					240	
Asn	Thr	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Phe	Ser	Lys	Asp	Cys	Gly	Arg	Met	Leu	
			245						250					255		
Thr	Arg	Met	Trp	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Cys	Gln	Gly	Leu	Met	Met	Val	Lys	
		260						265					270			
Pro	Cys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Asn	Val	Val	Met	Gln	Gly	Cys	Met	Ala	Gly	
		275					280					285				
Val	Val	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Trp	Arg	Glu	Tyr	Ile	Leu	Ser	Leu	Glu	
	290					295					300					

<400>	6	
ataggatccc ttcagcgggg aatgaacgtt c		31
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR primer	
<400>	7	
gggccagtgg atagacagat g		21
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR primer	
<400>	8	
cagggggccag tggatagacc gatg		24
<210>	9	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR primer	
<400>	9	
cagggggccag tggatagact gatg		24
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR primer	
<400>	10	
gctcactgga tggtaggaag atg		23
<210>	11	
<211>	1392	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	11	
atgaacttcg ggctcacctt gattttcctt gtccttactt taaaagggtgt ccagtgtgag		60
gtgcaactgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gaggatccct gaaactctcc		120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtcgc tatgccatgt cttgggttcg ccagattcca		180
gagaagatac tggagtgggt cgcagccatt gatagtagtg gtggtgacac ctactattta		240
gacactgtga aggaccgatt caccatctcc agagacaatg ccaataatac cctgcacctg		300
caaatgcgca gtctgaggte tgaggacaca gccttgattt actgtgtaag acaggggggg		360
gcttactggg gccaaaggga tctggtcact gtctctgcag ctagcaccaa gggcccctcg		420
gtcttcccc tggaaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc		480
ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc		540
agcggcggtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc		600
gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac		660

aagcccagca	acaccaagggt	ggacaagaaa	gttgagccca	aatcttgtga	caaaaactcac	720
acatgcccac	cgtgcccagc	acctgaactc	ctgggggggac	cgtcagtcct	cctcttcccc	780
ccaaaaccca	aggacaccct	catgatctcc	cggacccttg	aggtcacatg	cgtgggtggtg	840
gacgtgagcc	acgaagacce	tgagggtcaag	ttcaactgggt	acgtggacgg	cgtggagggtg	900
cataatgcca	agacaaagcc	gcggggaggag	cagtacaaca	gcacgtaccg	tgtgggtcagc	960
gtcctcaccg	tectgcacca	ggactggctg	aatggcaagg	agtacaagtg	caagggtctcc	1020
aacaaaagccc	teccagccccc	categagaaa	accatctcca	aagccaaagg	gcagcccccga	1080
gaaccacagg	tgtacaccct	gcccccatec	cgggatgagc	tgaccaagaa	ccagggtcagc	1140
ctgacctgcc	tgggtcaaagg	cttctatccc	agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	1200
gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	cctcccgtgc	tggactccga	cggctccttc	1260
ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	agcagggtggc	agcaggggaa	cgtcttctca	1320
tgtctcgtga	tgcattgaggc	tctgcacaa	cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	1380
ccgggtaaat	ga					1392

<210> 12

<211> 342

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

gagggtgcacc	tgggtggagtc	tggggggaggc	ttagtgaagc	ctggagggtc	cctgaaactc	60
tcttgtgcag	cctctggatt	cactttcagt	aactatgcca	tgtcttgggt	tegccagact	120
ccagagaaga	ggctggagtg	ggtegcagcc	attaataata	atgggtgatga	cacctactat	180
ttagacactg	tgaaggaccg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaaagaa	cacctgttac	240
ctgcaaatga	gcagctctgag	gtctgaggac	acagccctgt	attactgtgt	aagacaaggg	300
ggggcttact	ggggccaagg	gactctggtc	actgtctctg	ca		342

<210> 13

<211> 1413

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

atgggatgga	actggatctt	tatttttaatc	ctgtcagtaa	ctacagggtgt	ccactctgag	60
gtccagctgc	agcagctctgg	acctgagctg	gtgaagcctg	gggcttcagt	gaagatatcc	120
tgcaaggctt	ctggttactc	attcactggc	tactacatgc	actgggtgaa	gcaaagtcct	180
gaaaagagcc	ttgagtggat	tggagagatt	aatcctagca	ctgggtggtac	tacctacaac	240
cagaagttca	aggccaaggc	cacattgact	gtagacaaat	cctccagcac	agcctacatg	300
cagctcaaga	gcctgacatc	tgaggactct	gcagctctatt	actgtgcaag	gagggggcgga	360
ttaactggga	cgagcttctt	tgttacttgg	ggccaaggga	ctctgggtcac	tgtctctgca	420
gctagcacca	aggggcccatc	ggctcttccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	480
ggcacagccg	ccctggggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgtcg	540
tggaaactcag	gcggccctgac	cagcggcggtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	600
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	660
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agtttgagccc	720
aaatcttgtg	acaaaactca	cacatgccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctggggggga	780
ccgtcagtet	tectcttccc	cccaaaaacc	aaggacaccc	tcatgatctc	cgggacccct	840
gaggtcacat	gcgtgggtgggt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgagggtcaa	gttcaactgg	900
tacgtggacg	gcgtggagggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcggggagga	gcagtacaac	960
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgtectcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	1020
gagtacaagt	gcaagggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccategagaa	aacctctcc	1080
aaagccaaag	ggcagccccc	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	1140
ctgaccaaga	accagggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1200
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	1260

ctggactcgc	acggctcctt	cttctcttac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1320
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1380
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tga			1413
<210>	14					
<211>	354					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	14					
caggteactc	tgaagagagtc	tggeccctggg	atattgcagc	cctcccagac	cctcagtcctg	60
acttgttctt	tctctgggtt	ttcactgagc	acttatggta	tgggtgtagg	ttggattcgt	120
cagcccttcag	ggatgggtct	ggagtggctg	gccaacattt	ggtggatatga	tgctaagtac	180
tataactctg	acctgaagag	cgggtccaca	atctccaagg	atacctccaa	caaccaggtg	240
ttcctcaaga	tctccagtgt	ggacacttca	gatactgcc	catactactg	tgctcaaatg	300
ggactggcct	ggtttgctta	ctggggccaa	gggactctgg	tcactgtctc	tgc	354
<210>	15					
<211>	354					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	15					
caggteactc	tgaagagagtc	tggeccctggg	atattgcagc	cctcccagac	cctcagtcctg	60
acttgttctt	tctctgggtt	ttcactgagc	atattatggta	tgggtgtagg	ttggattcgt	120
cagcccttcag	ggaaggggtct	ggagtggctg	gccaacattt	ggtggaatga	tgataagtac	180
tataactcag	ccctgaagag	cgggtccaca	atctccaagg	atacctccaa	caaccaggtg	240
ttcctcaaga	tctccagtgt	ggacactgca	gatactgcc	catactactg	tgctcaata	300
ggttacttct	actttgacta	ctggggccaa	ggcaccactc	tcacagtctc	ctca	354
<210>	16					
<211>	1416					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	16					
atgaacttcg	ggctcacctt	gattttctctc	gtccttactt	taaaagggtgt	ccagtgtgag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggagactta	gtgaagcctg	gaggggacct	gaaactctcc	120
tgtgcagcct	ctggatccac	tttcagtaac	tatgccatgt	cttgggttcg	ccagaactcca	180
gagaagagggc	tggagtgggt	cgcagccatt	gatagtaatg	gagggtaccac	ctactatcca	240
gacactatga	aggaccgatt	caccatttcc	agagacaatg	ccaagaacac	cctgtacctg	300
caaatgaaca	gtctgaggtc	tgaagacaca	gcctttttatc	actgtacaag	acataatgga	360
gggtatgaaa	actacggctg	gtttgcttac	tggggccaa	ggactctgggt	cactgtctct	420
gcagctagca	ccaagggccc	atcggctctc	cccctggcac	cctcctccaa	gagcacctct	480
ggggggcacag	cggccctggg	ctgcctggtc	aaggactact	tccccgaacc	ggtgaecggtg	540
tcgtggaaact	caggcgccct	gaccagcggc	gtgcacacct	tcccggctgt	cctacagtcc	600
tcaggactct	actccctcag	cagcgtgggtg	accgtgccct	ccagcagctt	gggcacccag	660
acctacatct	gcaacgtgaa	tcacaagccc	agcaacacca	agggtggacaa	gaaagttgag	720
cccaaateit	gtgacaaaae	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	780
ggaccgtcag	tcttctctct	ccccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccggaac	840
cctgagggtca	catgcgtgggt	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgagggt	caagttcaac	900
tggtaactgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaaagacaa	agccgcggga	ggagcagtac	960
aacagcacgt	accgtgtgggt	cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	1020
aaggagtaca	agtgcagggt	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	1080
tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	cagggtgtaca	ccctgcccc	atcccgggat	1140
gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgcctgggtca	aaggcttcta	tcccagcgac	1200

atcgccggtgg	agtgaggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	1260
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcctc	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	1320
tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	1380
acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaatga			1416
<210>	17					
<211>	366					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	17					
gaggtgcagc	tgggtggagtc	tgggggagac	ttagtgaagc	ctggagggtc	cctgaaactc	60
tcctgtgcag	ccctctggatt	cactttcagt	agctatgcc	tgtcttgggt	tgcgcagact	120
ccagagaaga	ggctggagtg	ggctgcagcc	attaatagta	atggagggtac	cacctactat	180
ccagacacta	tgaaggaccg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaaaga	caccctgtac	240
ctgcaaatga	gcagctctgag	gtctgaagac	tcagccttgt	attactgtac	aagacataat	300
ggaggggtatg	aaaactacgg	ctgggtttgct	tactggggcc	aagggactct	ggtcaactgtc	360
tctgca						366
<210>	18					
<211>	1413					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	18					
atggaatcta	actggatact	tcctttttatt	ctgtcggtag	cttcaggggt	ctactcagag	60
gttcagctcc	agcagctctgg	gactgtgtctg	gcaaggcctg	gggcttcagt	gaagatgtcc	120
tgcaaggctt	ctggctacac	ctttactggc	tactggatgc	gctgggtaaa	acagaggcct	180
ggacagggtc	tggaatggat	tggcgcctatt	tatcctggaa	atagtgtatac	aacatacaac	240
cagaagttca	agggcaaggc	caaaactgact	gcagtcacat	ctgtcagcac	tgcctacatg	300
gaactcagca	gcctgacaaa	tgaggactct	gcgggtctatt	actgttcaag	atcggggggac	360
ctaactgggg	ggttttgctta	ctgggggccaa	gggactcttg	tcactgtctc	tacagccaaa	420
gctagcacca	agggcccatc	ggctcttcccc	ctggcacccct	cctccaagag	cacctctggg	480
ggcacagegg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccgggt	gacgggtgtcg	540
tggaaactcag	gcgcccctgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	600
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacccagacc	660
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agtttgagccc	720
aaatcttgtg	acaaaaactca	cacatgccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctggggggga	780
ccgtcagctc	tcctcttccc	cccaaaaacc	aaggacaccc	tcatgatctc	cgggaaccct	840
gaggtcacat	gcgtgggtgg	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgagggtcaa	gttcaactgg	900
tacgtggacg	gcgtggagggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggaggga	gcagtacaac	960
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgctctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	1020
gagtacaagt	gcaagggtctc	caacaaaagc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1080
aaagccaaaag	ggcagccccc	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcgcccatc	ccgggatgag	1140
ctgaccaaga	accagggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaa	gcttctatcc	cagcgacatc	1200
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	1260
ctggactccg	acggctctctt	cttctcttac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcagggtgg	1320
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1380
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tga			1413
<210>	19					
<211>	357					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	19					

gaggttcagc	tccagcagtc	tgggactgtg	ctgggcaaggc	ctgggggcttc	agtgaagatg	60
tcctgcaagg	cttctggcta	caccctttacc	ggctactgga	tgcactgggt	aaaacagagg	120
cctggacagg	gtcttggaatg	gattggcgct	at ttatcctg	gaaatagtga	tactaactac	180
aaccagaagt	tcaagggcaa	ggccaaaactg	actgcagtc	catctgcccag	cactgcctac	240
atggagctca	gcagcctgac	aaatgaggac	gctgcgggtct	atcactgtac	aagatcgggg	300
gacctaaactg	gggggcttgc	ttactgggggc	caagggactc	tggtcactgt	ctctgca	357

<210> 20

<211> 372

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

caggtccagc	tgcagcagcc	tggggctgaa	ctggtgaagc	ctgggggcttc	agtgaaactg	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacccttcaact	agctactgga	tgcattgggt	gaagcagagg	120
cctggacaag	gccttgagtg	gacgggagag	attgatcctt	ctgatagtta	tacttactac	180
aatcaaaaagt	tcagggggcaa	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccaa	cacagcctac	240
atgcaactca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcgggtct	attactgttc	aagatcaaat	300
ctgggtgatg	gtcactaccg	gtttcctgcg	tttccttact	ggggccaagg	gactctggtc	360
actgtctctg	ca					372

<210> 21

<211> 372

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

caggtccaac	tgcagcagcc	tggggctgaa	ctggtgaaac	ctgggggcttc	agtgaagctg	60
tcctgcaagg	cttctggcta	cacccttcacc	agctactgga	tgcactgggt	gaaacagagg	120
cctggacaag	gccttgaaatg	gattggtaca	attgaccctt	ctgatagtga	aactcactac	180
aatctacagt	tcaaggacac	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac	240
atgcagctca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcgggtct	attattgtat	aagaggcgcc	300
ttctatagtt	cctatagtta	ctggggcctgg	tttgcttact	ggggccaagg	gactctggtc	360
actgtctctg	ca					372

<210> 22

<211> 463

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met	Asn	Phe	Gly	Leu	Thr	Leu	Ile	Phe	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Lys	Gly	
1			5					10						15		
Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	
			20					25					30			
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	
			35				40				45					
Ser	Arg	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ile	Pro	Glu	Lys	Ile	Leu	
	50					55					60					
Glu	Trp	Val	Ala	Ala	Ile	Asp	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Leu	
65					70				75						80	
Asp	Thr	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Asn	Asn	
			85					90					95			
Thr	Leu	His	Leu	Gln	Met	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	
			100					105					110			
Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Gln	Gly	Gly	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	

		115					120					125					
Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu		
	130						135					140					
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys		
145					150					155					160		
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser		
			165						170					175			
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser		
			180					185					190				
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser		
	195						200					205					
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn		
	210					215					220						
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His		
225					230					235					240		
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
				245					250					255			
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
			260					265					270				
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
	275						280					285					
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
	290					295					300						
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
305					310					315					320		
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
				325				330						335			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
		340					345					350					
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
	355						360					365					
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu		
	370					375					380						
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
385					390					395					400		
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
				405				410						415			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg		
			420					425					430				
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu		
	435					440					445						
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
	450					455					460						

<210> 23

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Glu	Val	His	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Ala	Ile	Asn	Asn	Asn	Gly	Asp	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Thr	Val
	50					55					60				
Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Val	Arg	Gln	Gly	Gly	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
			100					105					110		
Ser	Ala														

<210> 24
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 24

Met	Gly	Trp	Asn	Trp	Ile	Phe	Ile	Leu	Ile	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Gly
1				5					10					15	
Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys
			20					25				30			
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
		35					40					45			
Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Ser	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn
65					70					75					80
Gln	Lys	Phe	Lys	Ala	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
				85					90				95		
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Gly	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Ser	Phe	Phe	Ala
		115					120					125			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys
	130					135					140				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
145					150					155					160
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
				165					170					175	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
			180					185					190		
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
		195					200					205			
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
	210					215					220				
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro
225					230					235					240
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 26

Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln
1				5				10						15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ile	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Asn	Ile	Trp	Trp	Asn	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala
	50					55					60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn	Gln	Val
65					70					75				80	
Phe	Leu	Lys	Ile	Ser	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ala	Gln	Ile	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												

<210> 27
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27

Met	Asn	Phe	Gly	Leu	Thr	Leu	Ile	Phe	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15	
Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Gly	Thr	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Phe
		35					40					45			
Ser	Asn	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Val	Ala	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro
65					70					75				80	
Asp	Thr	Met	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn
			85						90					95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe
			100					105					110		
Tyr	His	Cys	Thr	Arg	His	Asn	Gly	Gly	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Gly	Trp	Phe
		115					120					125			
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
			165						170					175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
			180					185					190		

Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
		195					200					205					
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys		
	210					215					220						
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu		
225					230					235					240		
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
				245					250					255			
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
			260					265					270				
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
		275					280					285					
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
	290					295					300						
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		
305					310					315					320		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
				325					330					335			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu		
			340					345					350				
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
		355					360					365					
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys		
	370					375					380						
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
385					390					395					400		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
				405					410					415			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
			420					425					430				
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
		435					440					445					
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		
	450					455					460						
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
465					470												
<210>	28																
<211>	122																
<212>	PRT																
<213>	Mus musculus																
<400>	28																
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ala	Ala	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Met		
	50					55					60						
Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		

65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	His	Asn	Gly	Gly	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Gly	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala						
		115					120								
<210>	29														
<211>	470														
<212>	PRT														
<213>	Mus musculus														
<400>	29														
Met	Glu	Ser	Asn	Trp	Ile	Leu	Pro	Phe	Ile	Leu	Ser	Val	Ala	Ser	Gly
1				5					10					15	
Val	Tyr	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Thr	Val	Leu	Ala	Arg
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Gly	Tyr	Trp	Met	Arg	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Asp	Thr	Thr	Tyr	Asn
65					70				75					80	
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Val	Thr	Ser	Val	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Asn	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Ser	Gly	Asp	Leu	Thr	Gly	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp
		115					120					125			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Thr	Ala	Lys	Ala	Ser	Thr	Lys
	130					135					140				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
145					150					155					160
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
			165						170					175	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
			180					185					190		
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
		195					200					205			
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
	210					215					220				
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro
225					230					235					240
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
			245						250					255	
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
			260					265					270		
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
		275					280					285			
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	290					295					300				

Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
305					310					315					320
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
				325					330					335	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
			340					345					350		
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
		355					360					365			
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
	370					375					380				
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
385					390				395						400
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
			405					410						415	
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
			420				425						430		
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	435						440				445				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	450					455					460				
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
465					470										

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Thr	Val	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala
1			5					10						15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
		20					25					30			
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
	35					40					45				
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					
Lys	Gly	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70				75						80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Asn	Glu	Asp	Ala	Ala	Val	Tyr	His	Cys
			85					90					95		
Thr	Arg	Ser	Gly	Asp	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
		100					105						110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala									
		115													

<210> 31

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5					10						15	

Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Arg	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ser	Arg	Ser	Asn	Leu	Gly	Asp	Gly	His	Tyr	Arg	Phe	Pro	Ala	Phe	Pro
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala				
		115					120								

<210> 32

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Thr	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Asn	Leu	Gln	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ile	Arg	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Trp	Ala	Trp	Phe	Ala
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala				
		115					120								

<210> 33

<211> 717

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 33

atgagtcctg	cccagttcct	gtttctgtta	gtgctctgga	ttcgggaaac	caacgggtgat	60
gttgtgatga	cccagactcc	actcactttg	tgggttacca	ttggacaacc	agcctccatc	120
tcttgcaagt	caagtcagag	cctcttagat	agtgatggaa	agacatatit	gaattgggtg	180
ttacagaggc	caggccagtc	tccaaaagcgc	ctaattctatc	tgggtgtctaa	attggactct	240
ggagccccctg	acagggttcac	tggcagtgga	tcaggggacag	atttcacact	gaaaatcagt	300
agagtggagg	ctgaggattt	gggaatttat	tattgctggc	aaggtaacaca	ttttccgctc	360
acgttcgggtg	ctgggaccaa	gctggagctg	aaacgtacgg	tggctgcacc	atctgtcttc	420
atcttcccgc	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaaactg	cctctgttgt	gtgcctgctg	480
aataacttct	atcccagaga	ggccaaaagta	cagtggaaagg	tggataacgc	cctccaatcg	540
ggtaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagg	600

agcaccctga	cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtcctacgc	ctgcgaagtc	660
acccatcagg	gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagcttca	acagggggaga	gtgtttga	717
<210>	34					
<211>	336					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	34					
gatgtttgtga	tgacceagtc	tccactcaact	ttgtctgatta	ccatttggaca	accagcctcc	60
atctctttgca	agtcaagtc	gagcctcttta	gatagtgatg	gaaagacata	tttgaattgg	120
ttgtttacaga	ggccaggcca	gtctccaaag	cgcctaactct	atctggtgtc	taaactggac	180
tctggagttcc	ctgacagggt	cactggcagt	ggatcaggga	cagatttctc	actgaaaatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tttggggaatt	tattattgct	ggcaagggtac	acatttttccg	300
ctcacgttcg	gtgctgggac	caagctggag	ctgaaa			336
<210>	35					
<211>	717					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	35					
atgagtcctg	tccagttcct	gtttctgtta	atgctctgga	ttcaggaaaac	caacgggtgat	60
gttgtgatga	cccagactcc	actgtctttg	tgggttacca	ttggacaacc	agcctctatc	120
tcttgcaagt	caagtcagag	cctcttataat	agtaatggaa	agacataattt	gaatttggtta	180
caacagaggc	ctggccaggc	tccaaagcac	ctaattgtatc	agggtgtccaa	actggaccct	240
ggcatccctg	acaggttcag	tggcagtggga	tcagaaaacag	attttacact	taaaatcagc	300
agagtgagg	ctgaagattt	gggagtttat	tactgcttgc	aaagtacata	ttatccgctc	360
acgttcgggtg	ctgggaacca	gctggagctg	aaacgtacgg	tggctgcacc	atctgtcttc	420
atcttcccgc	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaaactg	cctctgttgt	gtgcctgctg	480
aataacttct	atcccagaga	ggccaaagta	cagtggaaagg	tggataacgc	cctccaatcg	540
ggtaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	600
agcaccctga	cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtcctacgc	ctgcgaagtc	660
acccatcagg	gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagcttca	acagggggaga	gtgtttga	717
<210>	36					
<211>	324					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	36					
gacatcaaga	tgacceagtc	tccatcttcc	atgtatgcat	ctctaggaga	gagagtcact	60
atcacttgca	aggcgagtc	ggacattaat	aactatttaa	gctgggttcca	gcagaaaacca	120
gggaaatctc	ctaagaccct	gatctatcgt	gcaaacagat	tggtagatgg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggcaagat	tattctctca	ccatcagcag	cctggagtat	240
gaagatatgg	gaattaat	ttgtctacag	tgtgatgagt	ttcctccgtg	gacgttcggt	300
ggaggcacca	agctggaaat	caaa				324
<210>	37					
<211>	336					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	37					
gatgtttgtga	tgacccaaaac	tccactctcc	ctgcctgtca	gtcttggaga	tcaagcctcc	60
atctctttgca	gatctagtca	gagccttgta	cacagtaatg	gaaacacct	tttacattgg	120
tacctgcaga	agccaggcca	gtctccaaag	ctcctgatct	acaaagtttc	caaccgattt	180
tctgggggtcc	cagacagggt	cagtggcagt	ggatcaggga	cagatttcac	actcaagatc	240

agcagagtggtgg	aggctgagga	tctgggagtt	tatttctgct	ctcaaagtac	acatgttccg	300
tggacgttcg	gtggaggcac	caagctggaa	atcaaa			336
<210>	38					
<211>	705					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	38					
atgagacct	ccattcagtt	cctggggctc	ttgtttgttct	ggcttcatgg	tgttcagtgt	60
gacatccaga	tgacacagtc	tccatcctca	ctgtctgcat	ctctgggagg	caaagtcacc	120
atcacttgca	aggcaagtca	ggacattaac	aagaatatag	tttgggtacca	acacaagcct	180
ggaaaagggtc	ctaggctgct	catatgggtac	acatctacat	tacagccagg	catcccatca	240
aggttcagtg	gaagtgggtc	tgggagagat	tattccttca	gcatcagcaa	cctggagcct	300
gaagatatattg	caacttatta	ctgtctacag	tatgataatc	ttccacggac	gttcggtgga	360
ggcaccaaaac	tggaaatcaa	acgtacggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgccca	420
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	480
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	540
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	600
ctgagcaaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcaggggc	660
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gttga		705
<210>	39					
<211>	321					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	39					
gacatccaga	tgacacagtc	tccatcctca	ctgtctgcat	ctctgggagg	caaagtcacc	60
atcacttgca	aggcaagtca	ggacattaac	aagaatataa	tttgggtacca	acacaagcct	120
ggaaaagggtc	ctaggctgct	catatgggtac	acatctacat	tacagccagg	catcccatca	180
aggttcagtg	gaagtgggtc	tgggagagat	tattccttca	gcatcagcaa	cctggagcct	240
gaagatatattg	caacttatta	ctgtctacag	tatgataatc	ttccacggac	gttcggtgga	300
ggcaccaaagc	tggaaatcaa	a				321
<210>	40					
<211>	720					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	40					
atgaggttct	ctgctcagct	tctggggctg	cttgtgctct	ggatccctgg	atccactgca	60
gatatattgtga	tgacgcaggc	tgcatctctc	aatccagtca	ctcttggaac	atcaacttcc	120
atctcctgca	ggctctagtaa	gagtcctcta	catagtaatg	gcatcactta	tttgtattgg	180
tatctgcaga	agccaggcca	gtctcctcag	ctcctgattt	atcagatgtc	caaccttgcc	240
tcaggagttc	cagacagggt	cagtagcagt	gggtcaggaa	ctgattttcac	actgagaatc	300
agcagagtggt	aggctgagga	tgtgggtgtt	tattactgtg	ctcaaaaatct	agaacttccg	360
tatacggttcg	gategggggac	caagctggaa	ataaaacgta	cgggtggctgc	accatctgtc	420
ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	480
ctgaataaact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtggga	agggtggataa	cgccttccaa	540
tcgggtaact	cccaggagag	tgtcacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctc	600
agcagcacc	tgacgctgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaaagtcta	cgcctgcgaa	660
gtcaccatc	agggcctgag	ctcgcccgte	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgttga	720
<210>	41					
<211>	336					
<212>	DNA					

```

<213> Mus musculus
<400> 41
gatatattgtga tgacgcagggc tgcattctccc aatccagttca ctcttgggaac atcagcttccc      60
atctccttgea ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg      120
tttctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc      180
tcaggagttcc cagacagggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc      240
agcagagtgg aggcctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg      300
tatacggttcg gatcgggggac caagctggaa ataaaaa      336

```

<210> 42

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

```

<400> 42
gatatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga cagagtcagt      60
ctttccttgea gggccagcca tagtattagc aacttcctac actgggtatcc acaaaaaatca      120
catgagttctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatccctcc      180
aggttcagtg gcaatggatc agggacagat ttcactctca gtatcaacag tgtggagact      240
gaagatttttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaacatct ggtcgctcac gttcgggtgct      300
gggaccaagc tggagctgaa a      321

```

<210> 43

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

```

<400> 43
gacatttgtgc tcacccaatc tccaacttct ttggctgtgt ctctagggca gagtgtcacc      60
atctccttgea gagccagtga aagtgttgaa tattatggca ctagtttaat gcagtggtag      120
caacagaaac caggacagcc acccaaatc ctcatctatg gtgcatccaa cgtagaatct      180
gggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat      240
cctgtggagg aggatgatat tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggaa ggttccgtat      300
acgttcggat cgggggaccaa gctggaaata aaa      333

```

<210> 44

<211> 238

<212> PRT

<213> Mus musculus

```

<400> 44
Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu
1          5          10          15
Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val
          20          25          30
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
          35          40          45
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
          50          55          60
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
65          70          75          80
Gly Ala Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85          90          95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
100          105          110
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu

```

		115					120					125					
Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro		
	130					135					140						
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu		
145					150					155					160		
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn		
				165					170					175			
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser		
			180					185					190				
Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala		
	195					200						205					
Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly		
	210					215					220						
Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				
225					230					235							

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Ile	Gly		
1				5					10					15			
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser		
			20					25					30				
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser		
	35					40				45							
Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro		
	50					55				60							
Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile		
65				70					75					80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly		
			85					90					95				
Thr	His	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys		
			100					105					110				

<210> 46

<211> 238

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Met	Ser	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Met	Leu	Trp	Ile	Gln	Glu		
1				5					10					15			
Thr	Asn	Gly	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val		
			20					25					30				
Thr	Ile	Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu		
	35					40				45							
Leu	Tyr	Ser	Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro		
	50					55				60							
Gly	Gln	Ala	Pro	Lys	His	Leu	Met	Tyr	Gln	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Pro		
65				70					75					80			
Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Asp	Phe	Thr		

				85					90					95			
Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			100					105					110				
Leu	Gln	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu		
		115					120					125					
Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro		
	130					135					140						
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu		
145					150					155					160		
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn		
			165						170					175			
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser		
		180						185					190				
Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala		
	195					200						205					
Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly		
	210					215					220						
Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				
225					230					235							

<210> 47

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Asp	Ile	Lys	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly		
1			5					10					15				
Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr		
		20						25				30					
Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile		
	35					40					45						
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50				55					60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Tyr		
65				70				75						80			
Glu	Asp	Met	Gly	Ile	Asn	Tyr	Cys	Leu	Gln	Cys	Asp	Glu	Phe	Pro	Pro		
			85					90					95				
Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
		100						105									

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly		
1			5					10					15				
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser		
		20						25				30					
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser		
	35					40					45						
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro		

50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr	Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala	Glu Asp Leu Gly Val Tyr	Phe Cys Ser Gln Ser
	85	90
Thr His Val Pro Trp	Thr Phe Gly Gly Gly	Thr Lys Leu Glu Ile Lys
	100	105
		110

<210> 49
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 49

Met Arg Pro Ser Ile	Gln Phe Leu Gly Leu	Leu Leu Phe Trp Leu His
1	5	10
Gly Val Gln Cys Asp	Ile Gln Met Thr Gln	Ser Pro Ser Ser Leu Ser
	20	25
Ala Ser Leu Gly Gly	Lys Val Thr Ile Thr	Cys Lys Ala Ser Gln Asp
	35	40
Ile Asn Lys Asn Ile	Val Trp Tyr Gln His	Lys Pro Gly Lys Gly Pro
	50	55
Arg Leu Leu Ile Trp	Tyr Thr Ser Thr Leu	Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65	70	75
Arg Phe Ser Gly Ser	Gly Ser Gly Arg Asp	Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
	85	90
Asn Leu Glu Pro Glu	Asp Ile Ala Thr Tyr	Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
	100	105
Asn Leu Pro Arg Thr	Phe Gly Gly Gly Thr	Lys Leu Glu Ile Lys Arg
	115	120
Thr Val Ala Ala Pro	Ser Val Phe Ile Phe	Pro Pro Ser Asp Glu Gln
	130	135
Leu Lys Ser Gly Thr	Ala Ser Val Val Cys	Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145	150	155
Pro Arg Glu Ala Lys	Val Gln Trp Lys Val	Asp Asn Ala Leu Gln Ser
	165	170
Gly Asn Ser Gln Glu	Ser Val Thr Glu Gln	Asp Ser Lys Asp Ser Thr
	180	185
Tyr Ser Leu Ser Ser	Thr Leu Thr Leu Ser	Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
	195	200
His Lys Val Tyr Ala	Cys Glu Val Thr His	Gln Gly Leu Ser Ser Pro
	210	215
Val Thr Lys Ser Phe	Asn Arg Gly Glu Cys	
225	230	

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 50

Asp Ile Gln Met Thr	Gln Ser Pro Ser Ser	Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1	5	10
Gly Lys Val Thr Ile	Thr Cys Lys Ala Ser	Gln Asp Ile Asn Lys Asn

			20					25					30				
Ile	Ile	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile		
		35					40					45					
Trp	Tyr	Thr	Ser	Thr	Leu	Gln	Pro	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Asn	Leu	Pro	Arg		
				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys							
			100					105									

<210> 51
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 51

Met	Arg	Phe	Ser	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Trp	Ile	Pro		
1				5				10						15			
Gly	Ser	Thr	Ala	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Phe	Ser	Asn	Pro		
			20					25					30				
Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser		
		35				40					45						
Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys		
	50				55						60						
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Ala		
65					70					75					80		
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe		
				85				90						95			
Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr		
			100					105					110				
Cys	Ala	Gln	Asn	Leu	Glu	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys		
		115					120					125					
Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro		
	130					135					140						
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu		
145					150					155					160		
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp		
				165					170					175			
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp		
		180						185					190				
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys		
		195					200						205				
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln		
	210					215					220						
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			
225					230						235						

<210> 52
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ser Ile Ser Asn Phe
20 25 30
Leu His Trp Tyr Pro Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ile Trp Ser Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg

	85	90	95			
Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys						
	100	105	110			
<210>	55					
<211>	333					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	55					
cagatccagt	tggagcagtc	tggacctgag	ctgaagaagc	ctggagagac	agtcaagatc	60
tcctgcaagg	cttctgggta	tattttcaga	gactattcaa	tgcactgggt	gaagcaggct	120
ccaggaaaagg	gtttaaagtg	gatgggctgg	ataaacactg	agacgggtga	gccaacatat	180
gcagatgact	tcaagggacg	gtttgccttc	tctttggaaa	cctctgccag	cactgcctat	240
ttgcagatca	acaacctcaa	aaatgaggac	acggctacat	atttctgtac	tagcctttac	300
tggggccaag	ggactctggg	cactgtctct	gca			333
<210>	56					
<211>	372					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	56					
caggteactc	tgaagagagtc	tggccctggg	atattgcagc	cctcccagac	cctcagtcctg	60
acttgttctt	tctctgggtt	ttcactgagc	acttatggta	tgggtgtagg	ttggattcgt	120
cagccttcag	ggaagggctc	ggagtggctg	gccaacattt	ggtggcatga	tgataagttac	180
tataactcag	ccctgaagag	cggctcaca	atctccaagg	atatctccaa	caaccaggta	240
ttcctcaaga	tctccagtgt	ggacactgca	gatactgcca	catactactg	tgctcaaata	300
gccccctcgat	ataataagta	cgaaggcttt	tttgctttct	ggggccaagg	gactctggtc	360
actgtctctg	ca					372
<210>	57					
<211>	345					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	57					
caggttcaac	tgcagcagtc	tggggctgag	ctggtgaggc	ctggggcttc	agtgaagctg	60
tcctgcaagg	cttcggggcta	cacatttact	gactatgaaa	tgcactgggt	gaagcagaca	120
cctgtgcatg	gcctaaaatg	gattggagct	cttgatccta	aaactgggtga	tactgcctac	180
agtcagaagt	tcaagggcaa	ggccacactg	actgcagaca	aatcctccag	cacagcctac	240
atggagctcc	gcagcctgac	atctgaggac	tctgccgtct	attactgtac	aagattctac	300
tcctatactt	actggggcca	agggactctg	gtcactgtct	ctgca		345
<210>	58					
<211>	357					
<212>	DNA					
<213>	Mus musculus					
<400>	58					
gagggtgcagc	ttgttgagac	tgggtggagga	ctggtgcagc	ctgaagggtc	attgaaactc	60
tcatgtgcag	cttctggatt	cagcttcaat	atcaatgcca	tgaactgggt	ccgccaggct	120
ccaggaaaagg	gttttggaatg	ggttgctcgc	ataagaagtg	aaagtaataa	ttatgcaaca	180
tatttatggcg	attcagtga	agacaggttc	accatctcca	gagatgattc	acaaaacatg	240
ctctatctac	aaatgaacaa	cttgaaaact	gaggacacag	ccatatatta	ctgtgtgaga	300
gaggtaacta	categtttgc	ttattggggc	caagggactc	tggtcactgt	ctctgca	357
<210>	59					
<211>	369					

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 59

```
gagggtgcagc ttgttgagac tgggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc      60
tcatgtgcag cctctggatt cacccttcaat gccagtgcc tgaactgggt ccgccaggct      120
ccaggaaaagg gtttggaatg ggttgctcgc ataagaagta aaagtaataa ttatgcaata      180
tattatgccg attcagtgaag acacagggtt accatctcca gagatgattc acaaagcatg      240
ctctatctgc aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatgtatta ctgtgtgaga      300
gatccgggct actatggtaa cccctgggtt gcttactggg gccaaaggac tctggtcact      360
gtctctgca                                     369
```

<210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 60

```
Gln Ile Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1                               5                               10                               15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Arg Asp Tyr
                20                               25                               30
Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
                35                               40                               45
Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
                50                               55                               60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                               70                               75                               80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                85                               90                               95
Thr Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
                100                               105                               110
```

<210> 61

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

```
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1                               5                               10                               15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
                20                               25                               30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
                35                               40                               45
Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala
                50                               55                               60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ile Ser Asn Asn Gln Val
65                               70                               75                               80
Phe Leu Lys Ile Ser Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                               90                               95
Cys Ala Gln Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala
                100                               105                               110
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
                115                               120
```

<210> 62
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 62
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Lys Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala
 115

<210> 63
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 63
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ile Asn
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 64
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 64
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ala Ser

		20						25						30					
Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
		35					40					45							
Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp				
	50					55					60								
Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Gln	Ser	Met				
65					70				75					80					
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr				
			85					90					95						
Tyr	Cys	Val	Arg	Asp	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Pro	Trp	Phe	Ala	Tyr				
		100				105					110								
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala									
		115				120													

```

<210> 65
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 65
gatgtttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcgggta cccttggaca accagcctcc 60
atctctttgca agtcaagtea gagectctta catagtgatg gaaagacatt tttagaattgg 120
ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactt atctgggtgc tagactggac 180
tctggagttcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggcctgagga tttgggagtt tattattgct gccaaaggta acattttcct 300
cggacgttcg gtggaggcac caggctggaa atcaaa 336

<210> 66
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 66
gatgtttttga tgacccaaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctctttgca gatctagtea gagecttgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatctt acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggcctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtt acatgtttccg 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 67
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 67
gatgtttgtga tgacccaaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctctttgca gatctagtea gagecttgta cacagtaatg gaaacaccta tttagaattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatctt acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggcctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaaaata acatgtttcct 300
cctacgttcg gatcgggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 68
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

```

<400> 68
gatatattgtga tgactcagtc tgcaccctct gtacctgtca ctccctggaga gtcagtatcc 60
atctcctgca agtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgaattgg 120
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcaa ctcttgattt attggatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatat agaataccct 300
ttcacgttcg gcacggggac aaaattggaa ataaaa 336

<210> 69

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 69
gatatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagttatg acatcactta tttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttcct 300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 70

<211> 318

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 70
caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ttccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgttagt tacatgtact ggtaccagca gaagtcagga 120
tcctcccccga gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg ctcttgaggt cctctgttcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagttacc cgctcacgtt cgggtgggtgg 300
accgagctgg agctgaaa 318

<210> 71

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Cys Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	
Ser	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105						110	

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Asn
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105						110	

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	Ser	Val	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile

65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
				85					90					95	
Ile	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Phe	Ser	Asn	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Thr	Ser	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25					30		
Tyr	Asp	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40				45				
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile
65					70				75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn
			85					90					95		
Leu	Glu	Leu	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100				105						110		

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Phe	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
		20						25				30			
Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
		35					40				45				
Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu
65					70				75					80	
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr
			85					90					95		
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Leu	Glu	Leu	Lys						
			100				105								

<210> 77

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 77

caggtgcagc	tggtggagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggggccctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacccttcacc	gactatgaaa	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggagct	cttgatccta	aaactgggtga	tactgcctac	180
agtcagaagt	tcaagggcag	agtcacgatt	accgcggacg	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagattctac	300
tcctatactt	actggggcca	gggaaccctg	gtcacctct	cctca		345

<210> 78

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 78

caggtgcagc	tggtggagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggggccctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacccttcacc	gactatgaaa	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggagct	cttgatccta	aaactgggtga	tactgcctac	180
agtcagaagt	tcaagggcag	agtcacgctg	accgcggacg	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtac	aagattctac	300
tcctatactt	actggggcca	gggaaccctg	gtcacctct	cctca		345

<210> 79

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 79

caggtgcagc	tggtggagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggggccctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacccttcacc	gactatgaaa	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggagct	cttgatccta	aaactgggtga	tactgcctac	180
agtcagaagt	tcaagggcag	agtcacgctg	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtac	aagattctac	300
tcctatactt	actggggcca	gggaaccctg	gtcacctct	cctca		345

<210> 80

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 80

caggtgcagc	tggtggagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggggccctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacccttcacc	gactatgaaa	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggagct	cttgatccta	aaactgggtga	tactgcctac	180
agtcagaagt	tcaagggcag	agtcacgctg	accgcggaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgac	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtac	aagattctac	300
tcctatactt	actggggcca	gggaaccctg	gtcacctct	cctca		345

<210> 81

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 81

```
cagggtgcagg tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata cacccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac      180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggacg aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac      300
tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca                          345
```

<210> 82

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 82

```
cagggtgcagg tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata cacccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac      180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac      300
tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca                          345
```

<210> 83

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 83

```
cagggtgcagg tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata cacccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac      180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac      300
tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca                          345
```

<210> 84

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 84

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
              20              25              30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
              35              40              45
Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
              50              55              60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
```

65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser													
		115													

<210> 85

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 85

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		
Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ala	Leu	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser													
		115													

<210> 86

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 86

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		
Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ala	Leu	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

<210> 87

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 87

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 88

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

<210> 89

<211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Mouse-human chimeric antibody H chain
 <400> 89
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 90
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Mouse-human chimeric antibody H chain
 <400> 90
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 91
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Mouse-human chimeric antibody L chain

<400> 91

```
gatgtttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc      60
atctcctgca gatctagtc gagecttgta cacagtaatg gaaacaceta ttacattgg      120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc      240
agcagagtgg aggcctgagga tgttgggggt tattactgct ctcaaaatac acatgttcct      300
cctacgtttg gccaggggac caagctggag atcaaaa      336
```

<210> 92

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody L chain

<400> 92

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1              5              10              15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
              20              25              30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
              35              40              45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
              50              55              60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
              85              90              95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
              100              105              110
```

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 93

```
Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser
1              5              10
```

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 94

```
Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
1              5
```

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 95

```
Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn
1              5
```

```

<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 96
Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser
1 5
<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 97
Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr
1 5 10
<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 98
Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His
1 5 10
<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 99
Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu
1 5 10
<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 100
Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn
1 5 10
<210> 101
<211> 27
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 101
Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
1 5 10 15
His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys
20 25
<210> 102
<211> 14
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 102
Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys

```



```

1                5                10
<210>  103
<211>   5
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  103
Asn Tyr Ala Met Ser
1                5
<210>  104
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  104
Ala Ile Asn Asn Asn Gly Asp Asp Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys
1                5                10                15
Asp

<210>  105
<211>   5
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  105
Gln Gly Gly Ala Tyr
1                5
<210>  106
<211>   7
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  106
Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly
1                5
<210>  107
<211>  16
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  107
Asn Ile Trp Trp Tyr Asp Ala Lys Tyr Tyr Asn Ser Asp Leu Lys Ser
1                5                10                15

<210>  108
<211>   8
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  108
Met Gly Leu Ala Trp Phe Ala Tyr
1                5
<210>  109
<211>   7
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  109

```

Ile Tyr Gly Met Gly Val Gly

1 5

<210> 110

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 110

Asn Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 111

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

Ile Gly Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 112

Gly Tyr Trp Met His

1 5

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 114

Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Leu Ala Tyr

1 5 10

<210> 115

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 115

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 116

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 116
Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 117
His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 118
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 119
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 119
Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15
Gly

<210> 120
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 120
Ser Asn Leu Gly Asp Gly His Tyr Arg Phe Pro Ala Phe Pro Tyr
1 5 10 15

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 121
Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Leu Gln Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 122
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 122
Gly Ala Phe Tyr Ser Ser Tyr Ser Tyr Trp Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15
 <210> 123
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 123
 Asp Tyr Glu Met His
 1 5
 <210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 124
 Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 125
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 125
 Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr
 1 5

<210> 126
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 126
 Ile Asn Ala Met Asn
 1 5

<210> 127
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 127
 Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Asp

<210> 128
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 128
 Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 129
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 129

Ala Ser Ala Met Asn

1 5

<210> 130

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 130

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 131

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 131

Asp Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 132

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 132

Asp Tyr Ser Met His

1 5

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 133

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 134

<211> 2

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 134

Leu Tyr

1

<210> 135

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 135

Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 136
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 136
 Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala Phe
 1 5 10

<210> 137
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 137
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 138
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 138
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

<210> 139
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 139
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 140
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 140
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 141
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 141
 Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
 1 5

<210> 142
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 142
 Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Pro Trp Thr
 1 5 10

<210> 143

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 143
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 144
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 144

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 145
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 145

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 146
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 146

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 147
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 147

Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 148
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 148

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 149
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 149

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Asn Ile Ile
 1 5 10

<210> 150
 <211> 7

```

<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  150
Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro
1          5
<210>  151
<211>  6
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  151
Leu Gln Tyr Asp Asn Leu
1          5
<210>  152
<211>  11
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  152
Arg Ala Ser His Ser Ile Ser Asn Phe Leu His
1          5          10
<210>  153
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  153
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1          5
<210>  154
<211>  9
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  154
Gln Gln Ser Asn Ile Trp Ser Leu Thr
1          5
<210>  155
<211>  15
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  155
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Met Gln
1          5          10          15
<210>  156
<211>  7
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  156
Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser
1          5
<210>  157
<211>  9
<212>  PRT

```


<213> Mus musculus
 <400> 157
 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 158
 Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 159
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 159
 Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 160
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 160
 Trp Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 161
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 161
 Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 162
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 162
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Tyr Asp Ile Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15
 <210> 163
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 163
 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 164
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 164
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10
 <210> 165
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 165
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 166
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 166
 Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 167
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 167
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 168
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 168
 Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser
 1 5
 <210> 169
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 169
 Cys Gln Gly Thr His Phe
 1 5
 <210> 170
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 170
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 171
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 171

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 172

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 172

cttgtacaca gtgacggaaa cacctat

27

<210> 173

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 173

ataggtgttt ccgtcactgt gtacaag

27

<210> 174

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 174

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 175

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 175

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asp Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 176

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 176

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 177

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

```

<223>  mutant antibody L chain
<400>  177
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His
1           5           10           15
<210>  178
<211>  16
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<220>
<223>  mutant antibody L chain
<400>  178
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn His Asn Thr Tyr Leu His
1           5           10           15
<210>  179
<211>  16
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<220>
<223>  mutant antibody L chain
<400>  179
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asn Asn Thr Tyr Leu His
1           5           10           15
<210>  180
<211>  16
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<220>
<223>  mutant antibody L chain
<400>  180
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His
1           5           10           15
<210>  181
<211>  16
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<220>
<223>  mutant antibody L chain
<400>  181
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His
1           5           10           15
<210>  182
<211>  17
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<220>
<223>  mutant antibody L chain
<400>  182
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Ile Asn Thr Tyr Leu
1           5           10           15
His

```

<210> 183
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 183
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 184
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 184
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 185
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 185
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ser Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 186
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 186
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Trp Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 187
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 187
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Tyr Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 188
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 188
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 189

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 189

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 190

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 190

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Pro Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 191

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 191

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 192

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 192

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Asp	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
			85					90					95		
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
		100						105					110		

<210> 193

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 193

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Glu	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
			85					90					95		
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
		100						105					110		

<210> 194

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 194

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Phe	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro

50	55	60			
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
65	70	75	80		
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu
	85	90	95		
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr
	100	105	110		

<210> 195

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 195

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
		20						25					30		
Asn	His	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
			85					90					95		
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
		100					105						110		

<210> 196

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 196

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Asn	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
			85					90					95		
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
		100					105						110		

<210> 197

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 197
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 198
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 198
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 199
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 199
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Ile	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 200

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 200

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Lys	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 201

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 201

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Leu	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 202
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 202

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Ser	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 203
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mutant antibody L chain
 <400> 203

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Trp	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 204
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 204

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Tyr	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
				85				90					95		
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 205

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 205

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Arg	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn
				85				90					95		
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 206

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 206

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Val	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser

		35					40				45					
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	
	50					55					60					
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
65				70						75				80		
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn	
			85					90					95			
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
		100					105					110				

<210> 207

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

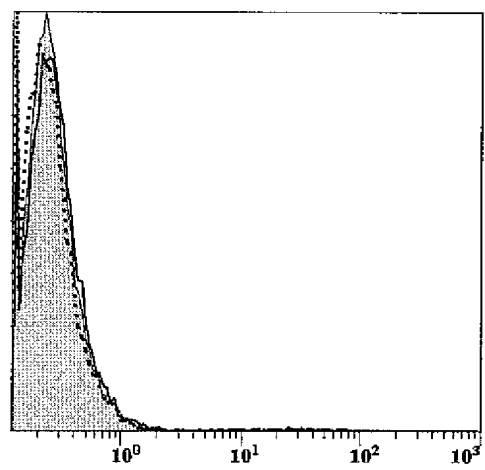
<220>

<223> mutant antibody L chain

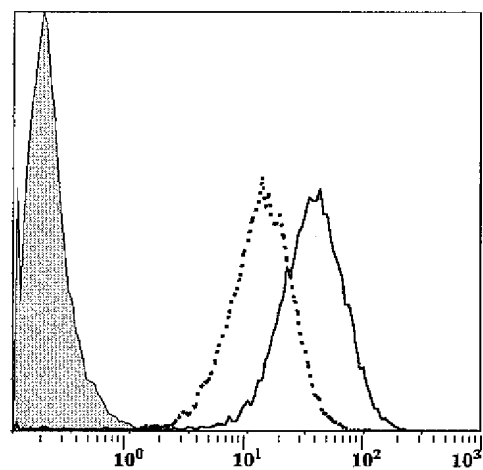
<400> 207

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	
1			5					10					15			
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	
		20					25					30				
Asn	Pro	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
	35					40				45						
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	
	50					55				60						
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
65				70						75				80		
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn	
			85					90					95			
Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
		100					105					110				

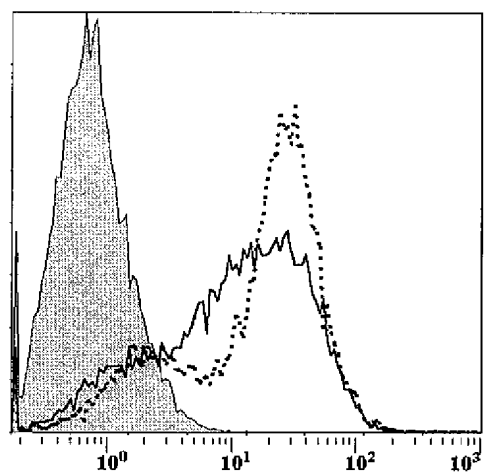
CHO



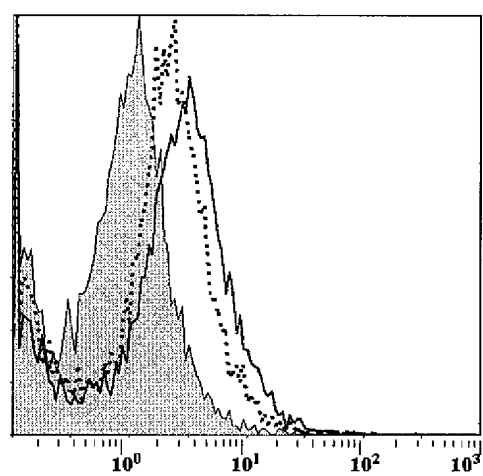
CHO/ヒトGPC3



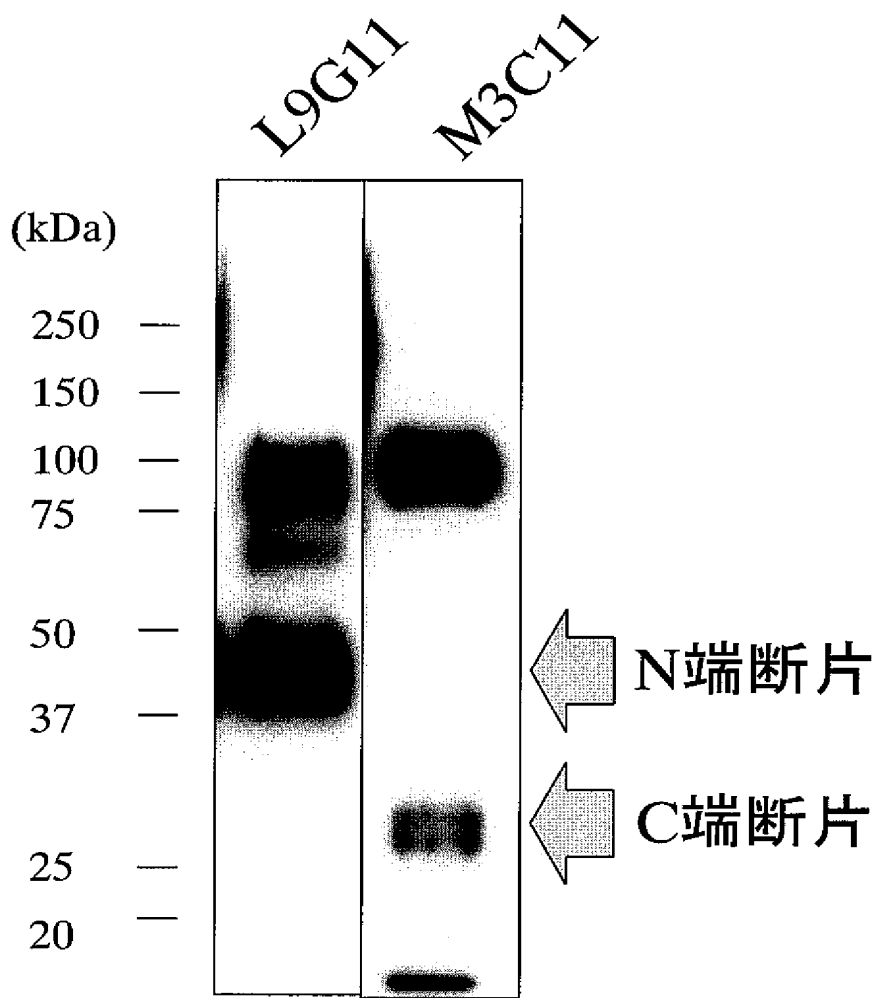
HepG2

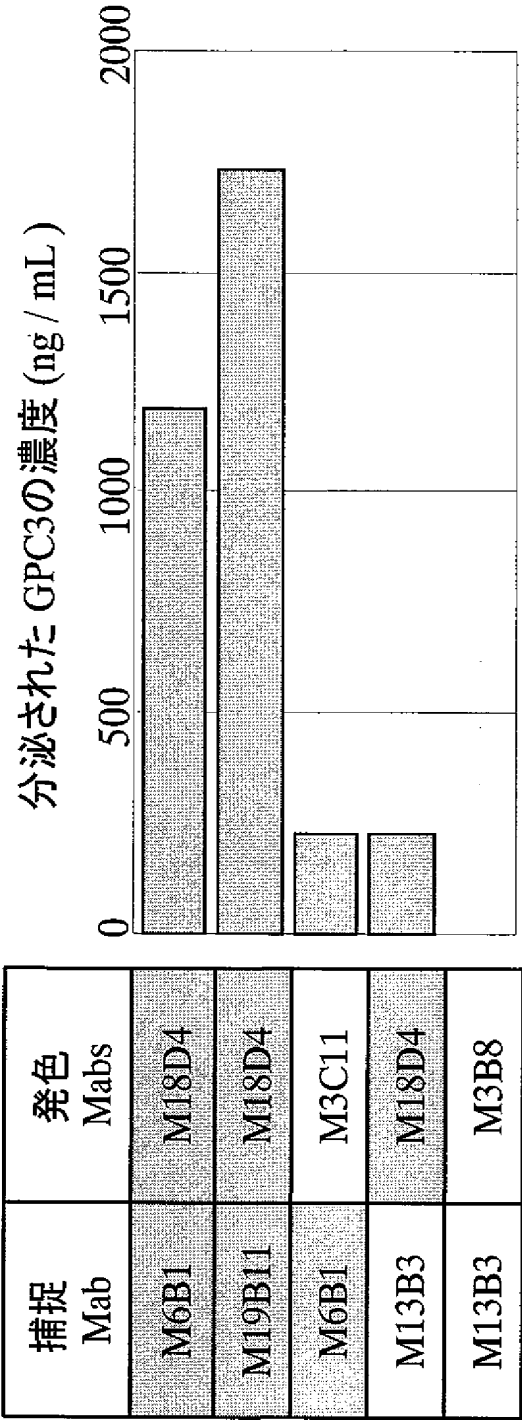


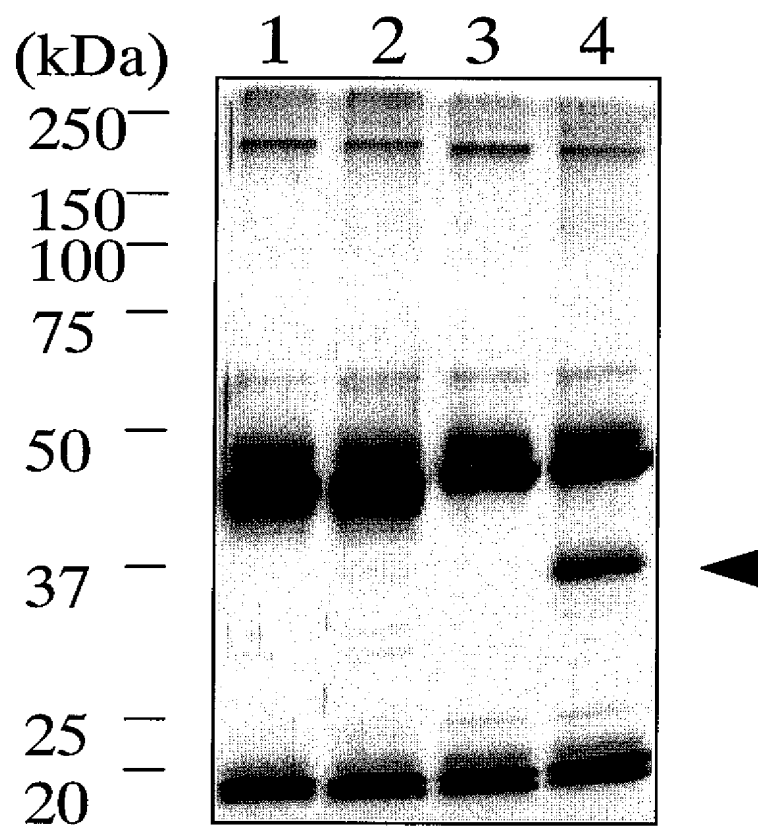
HuH-7



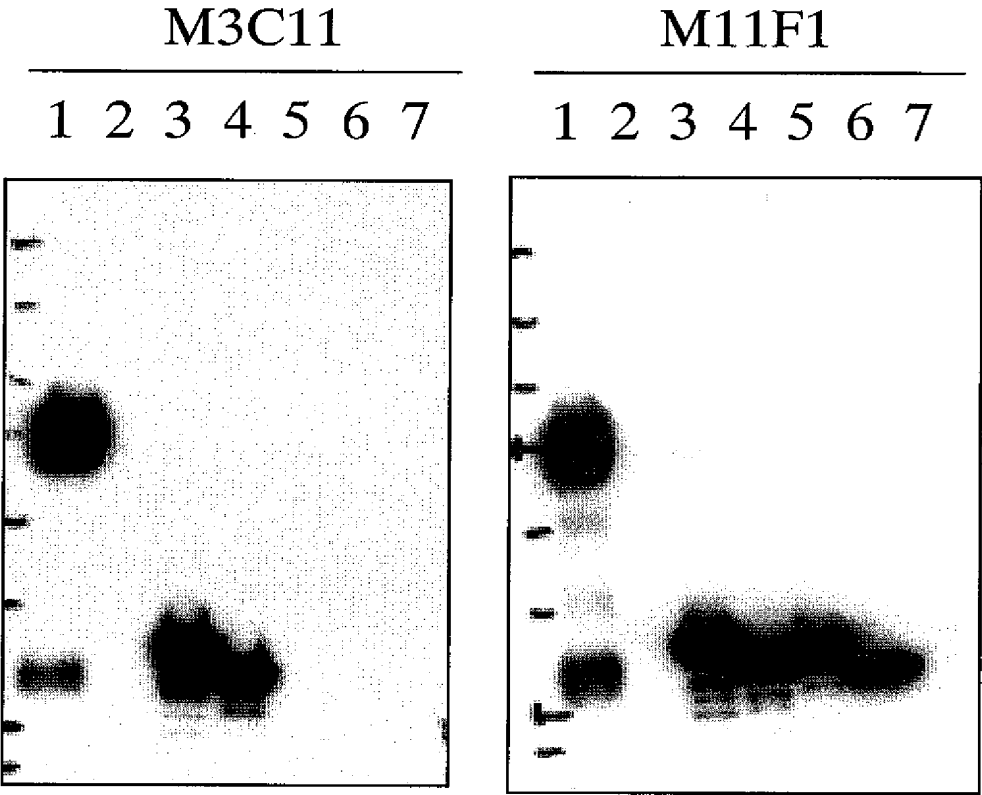
Mab	示されるビオチン化 Mab の sGPC3 コアへの結合の阻害 (%)								エピトープ位置	
	M3C11	M1E7	M11F1	M6B1	M18D4	M5B9	M10D2	L9G11		
M3C11	96.8	96.2	12.0	11.2	10.3	9.1	39.9	33.1	a	
M13B3	71.3	95.7	15.6	9.3	2.7	-1.8	22.3	24.9		
M1E7	26.0	83.9	14.3	7.7	9.0	6.4	14.8	38.0		
M3B8	1.8	28.4	97.4	15.2	12.6	3.6	29.0	36.0	b	
M11F1	2.0	3.9	81.8	5.6	-1.5	5.4	24.6	20.9		
M19B11	-4.1	-9.4	3.1	87.6	44.1	31.0	14.2	-9.8	c	
M6B1	-5.7	-2.7	13.9	85.6	51.9	44.4	6.7	1.1		
M18D4	0.2	0.5	-0.3	38.6	89.0	89.4	19.1	6.7		
M5B9	0.1	2.7	5.3	23.2	77.3	77.3	13.4	10.3		
M10D2	-7.7	0.6	7.8	-5.9	-21.6	-10.3	79.2	7.2	d	
L9G11	2.1	-4.8	6.0	10.1	15.7	6.4	1.2	92.2	e	



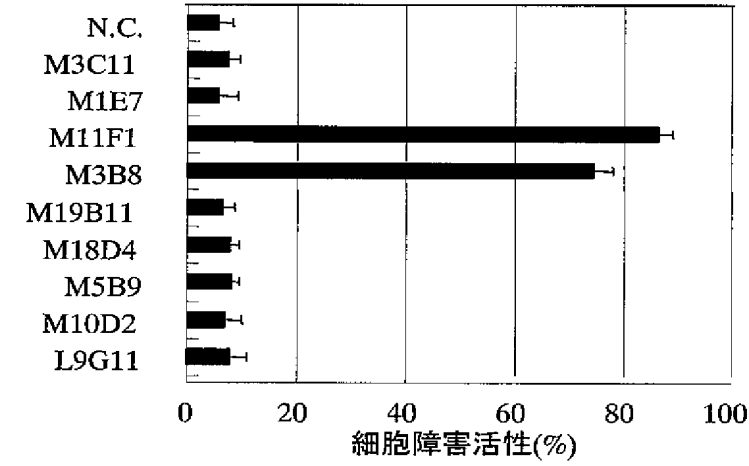




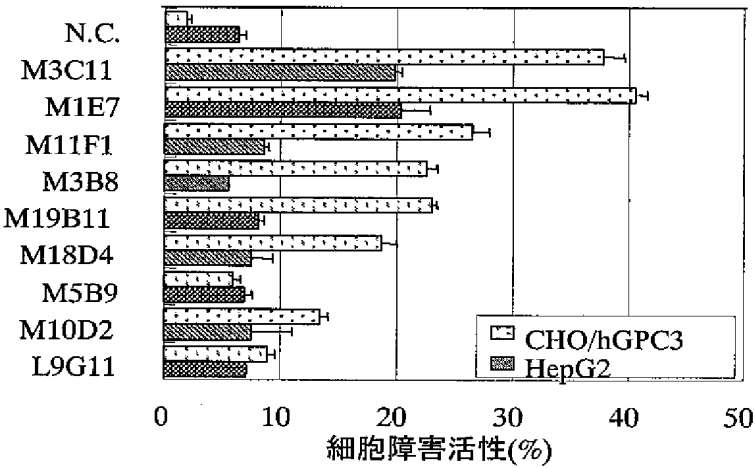
【 図 6 】



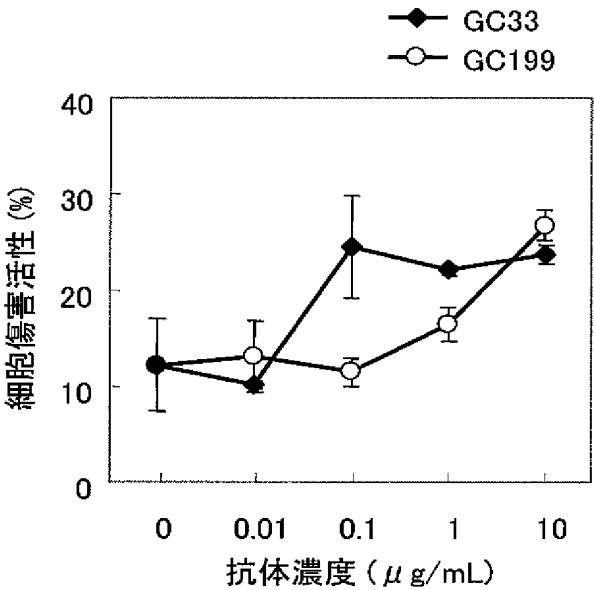
【 図 7 】



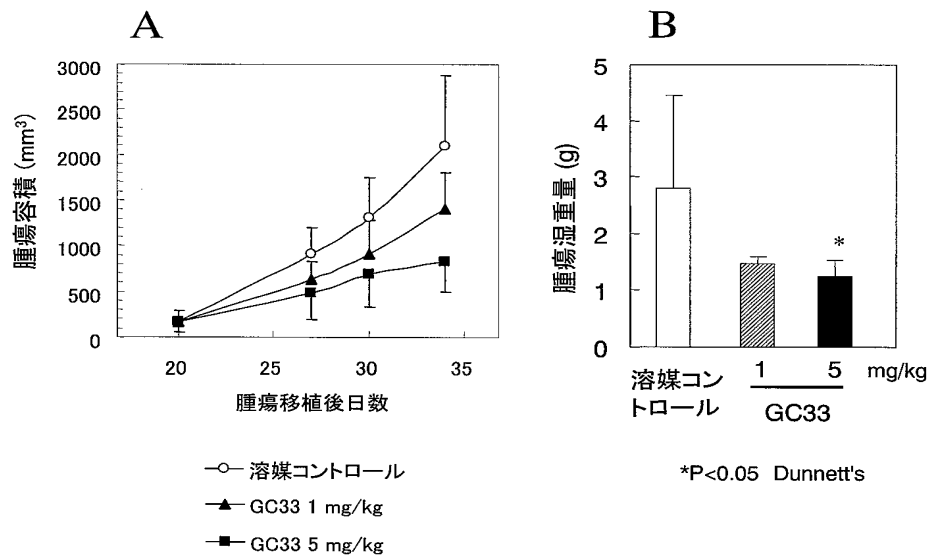
【 図 8 】



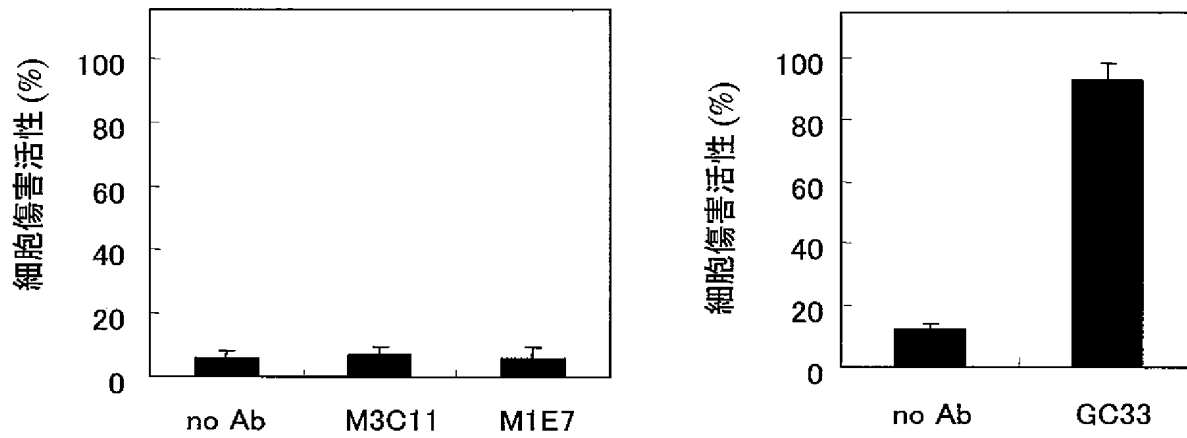
【 図 9 】



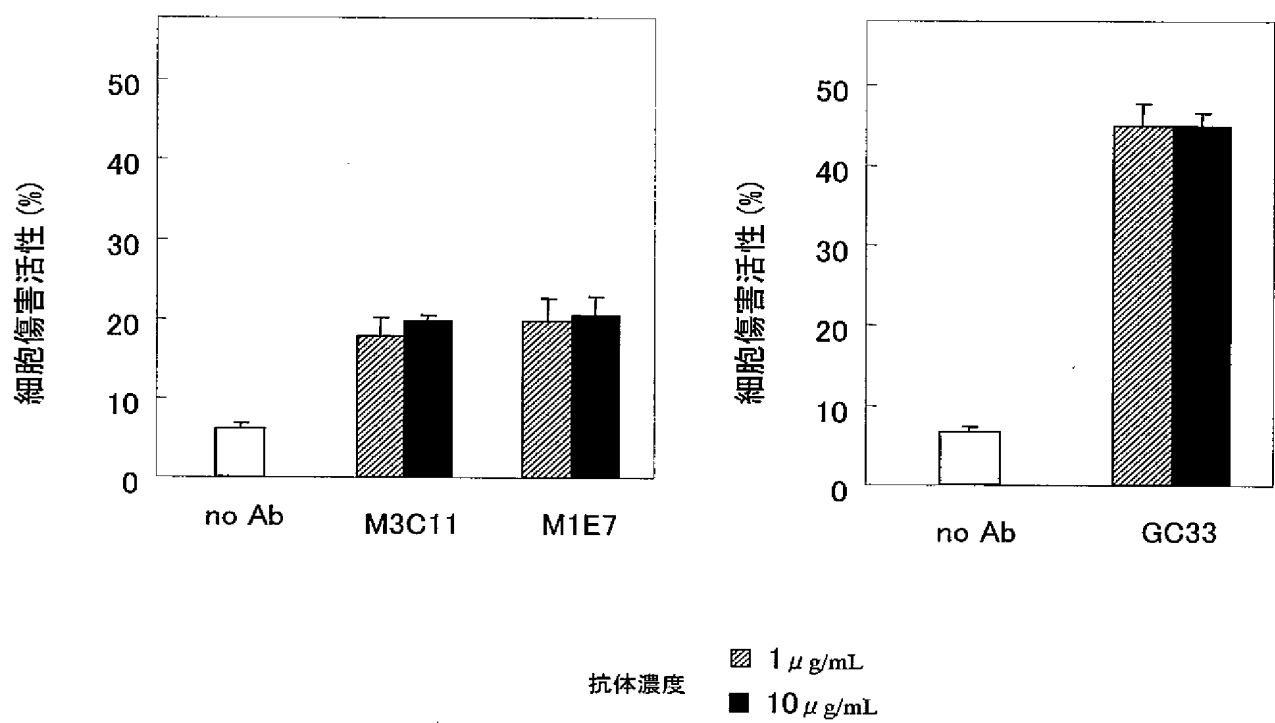
【図 1 0】



【図 1 1】

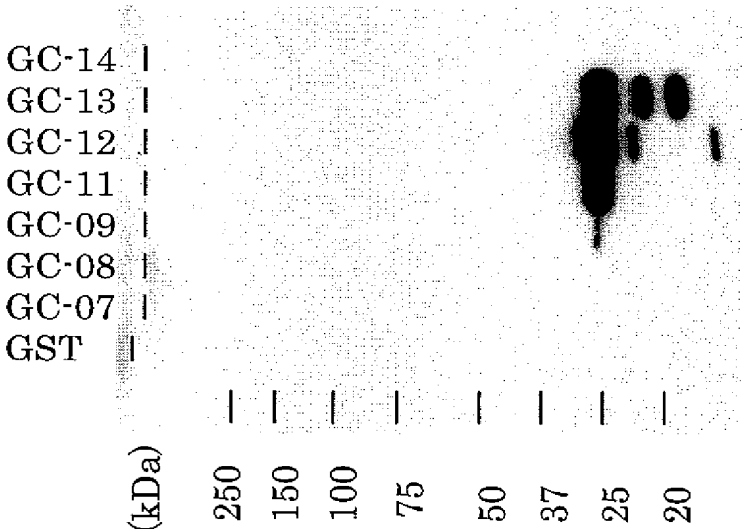


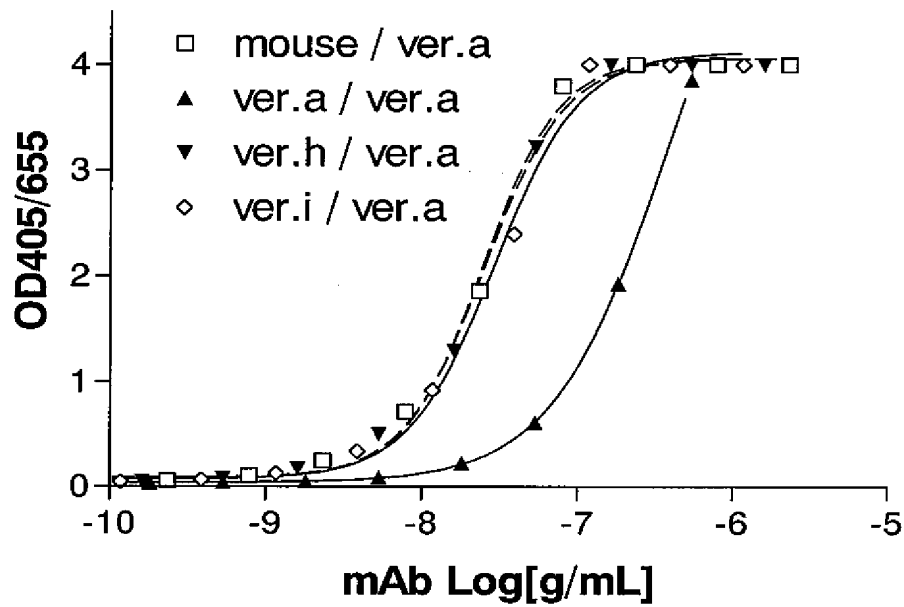
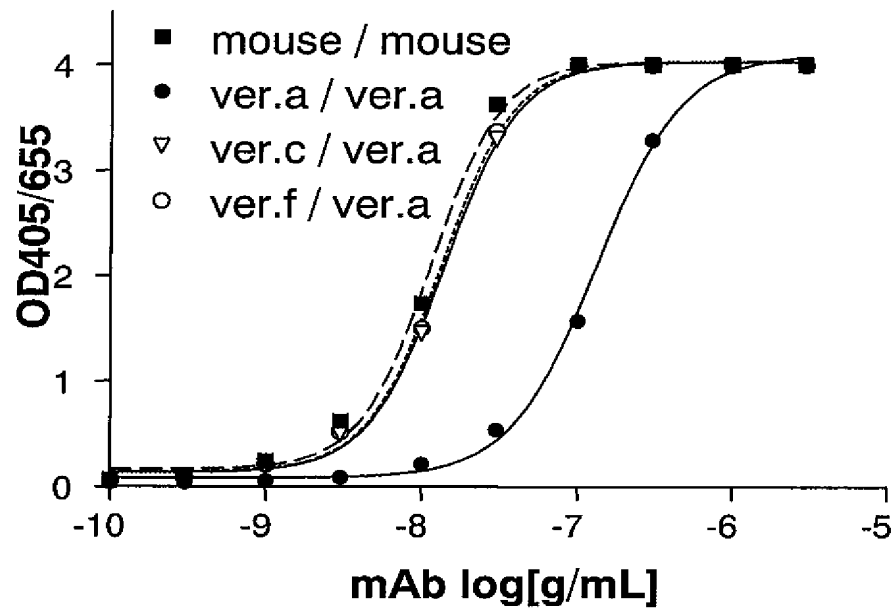
【図 1 2】



【図 1 3】

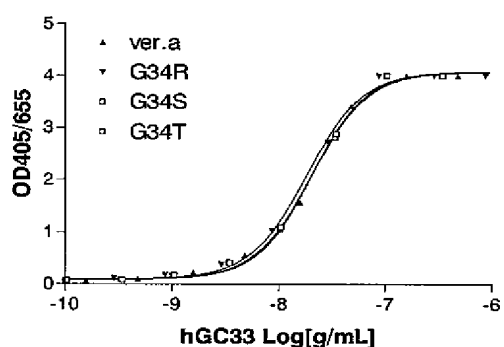
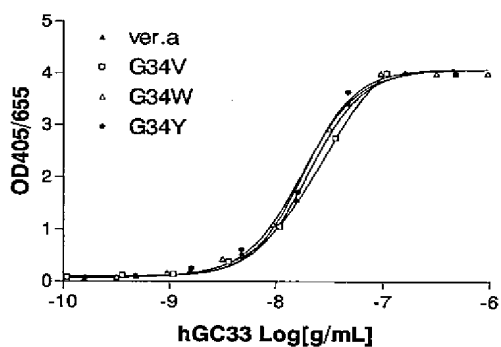
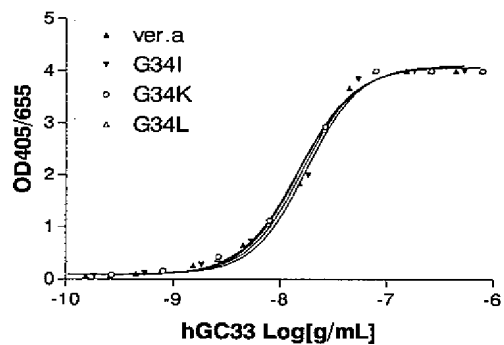
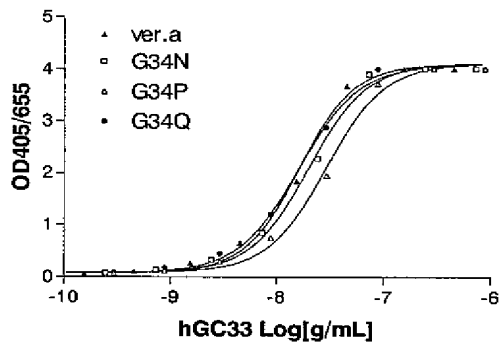
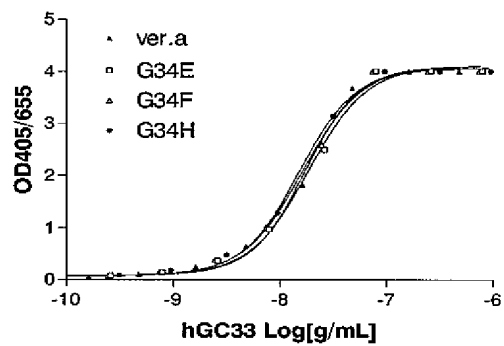
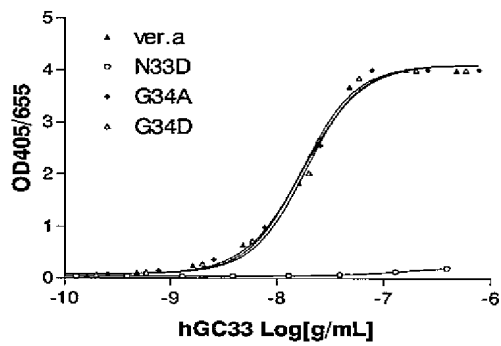
		GC33 WB
GC-4	GNSQQATPKDNEISTFHNLGNVHSPLK	○
GC-5	STFHNLGNVHSPLK	×
GC-6	GNSQQATPKDNEIS	×
GC-7	GNSQQATP	×
GC-8	QQATPKDN	×
GC-9	TPKDNEIS	×
GC-11	ATPKDNEIST	○
GC-12	PKDNEISTFH	○
GC-13	DNEISTFHNL	○
GC-14	EISTFHNLGN	×





クローン ID	アイソ タイプ	ELISA	BIAcore			エピトープ		FACS				免疫 沈殿
		EC50 (nM)	ka (1/Ms /10 ⁵)	kd (1/s x10 ⁵)	KD (nM)	競合 ELISA	ウエスタン ブロットニング	CHO/ human GPC3	HepG2	HuH-7	CHO	
M3C11	IgG1	0.12	2.5	6.5	0.3	a	GC-2	83	59	9	-	△
M13B3	IgG1	0.25	N.D.	N.D.	N.D.			N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.
M1E7	IgG1	0.96	1.5	42.7	2.8			28	16	5	-	×
M3B8	IgG1	0.56	2.7	467.0	17.6	b	GC-4	12	6	3	-	×
M11F1	IgG2b	2.17	1.4	3.5	0.2			9	4	2	-	×
L9G11	IgG1	0.62	1.3	140.0	10.7	e	N	29	26	4	-	○
M19B11	IgG1	0.18	1.5	17.1	1.1	c		39	44	3	-	○
M6B1	IgG1	5.51	N.D.	N.D.	N.D.			37	34	3	-	○
M18D4	IgG1	0.85	0.8	49.6	6.2			22	20	2	-	○
M5B9	IgG1	1.13	0.6	139.0	23.5			25	23	2	-	○
M10D2	IgG1	1.04	1.1	49.6	4.7	d		20	29	3	-	○

クローン ID	アイソ タイプ	ELISA	エピトープ		FACS			
			競合 ELISA	ウエスタン ブロットニング	CHO/ ヒト GPC3	HepG2	HuH-7	CHO
GC199	IgG1	0.10	b	GC-4	15.5	12.2	2.4	-
GC202	IgG1	0.10			6.0	0.9	1.4	-
GC33	IgG2a	0.24			82.7	52.0	8.4	-
GC179	IgG2b	5.61	f	GC-3	7.1	6.5	3.8	-
GC194	IgG1	3.83			5.0	7.9	1.5	-



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来の抗体と比較して高いADCC活性およびCDC活性を有する抗GPC3抗体を提供すること。

【解決手段】 グリピカン3の特定の領域に結合することができる抗体、ならびにこの抗体に基づいて作成されたヒト化抗体が提供される。本発明の抗体は、細胞増殖抑制剤として、抗癌剤として、および癌の診断薬として有用である。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 0 0 3 3 1 1

19900905

新規登録

5 9 6 0 5 8 8 8 9

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

中外製薬株式会社